

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Pro-entzündliche Effekte extrazellulärer Histone
und protektive Wirkung von anti-Histon Immunglobulin G
bei akuter Nierenschädigung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Rebecca Scherbaum

aus Ulm

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph A. W. Rupp

Prof. Dr. Michael Kiebler

Prof. Dr. André Brändli

Prof. Dr. med. Reinhard Lorenz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2015

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2011 bis Dezember 2013 im Forschungslabor des Nephrologischen Zentrums der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV (Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke), Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren.

Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unterstützt.

Aus diesem Promotionsprojekt ging die folgende Originalarbeit hervor:

Allam R*, **Scherbaum CR***, Darisipudi MN*, Mulay SR, Hagele H, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, Uhl B, Reichel CA, Krombach F, Monestier M, Moreth K, Schaefer L, Anders HJ. *Histones from Dying Renal Cells Aggravate Kidney Injury via TLR2 and TLR4. Journal of the American Society of Nephrology.* 2012; 23(8):1375-88

*geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Versicherung

Ich, **Christina Rebecca Scherbaum**, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Pro-entzündliche Effekte extrazellulärer Histone und protektive Wirkung von anti-Histon Immunglobulin G bei akuter Nierenschädigung“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.03.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Meinen Eltern und Schwestern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Akute Nierenschädigung	2
1.1.1	Epidemiologie, Definition und Klassifikation der akuten Nierenschädigung	2
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese der akuten Nierenschädigung	4
1.1.3	Tiermodelle der akuten Nierenschädigung	5
1.1.4	Interventionen zur Prophylaxe der akuten Nierenschädigung	8
1.2	Immunsystem	10
1.2.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem	10
1.2.2	Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem	11
1.2.3	Inflammatorische und chemotaktische Zytokine	17
1.2.4	Spezielle Rolle der Leukozyten bei Entzündungsreaktionen	18
1.3	Die Rolle des Immunsystems bei akuter Nierenschädigung.....	21
1.3.1	Immunantwort bei ischämischer akuter Nierenschädigung	21
1.3.2	Immunantwort bei septischer akuter Nierenschädigung.....	22
1.4	Histone	23
1.4.1	Chemische Struktur	23
1.4.2	Physiologische Funktion intrazellulärer Histone	23
1.4.3	Spezielle Rolle der extrazellulären Histone	25
1.4.4	In-vitro Studien zur Interaktion von Histonen und TLR 2/4	26
1.5	Fragestellung und Hypothese	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Zellkultur	29
2.1.2	Zelllinien.....	31
2.1.3	ELISA.....	32
2.1.4	Tierversuche	32
2.1.5	Molekularbiologische Analysen	33
2.1.6	Histologie	35
2.1.7	Software.....	35
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Kulturbedingungen, Zählung und Einfrieren von Zellen.....	36
2.2.2	Isolierung von murinen primären Zellpopulationen der Niere	39
2.2.3	Stimulation renaler Zellen mit extrazellulären Histonen	41
2.2.4	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	41
2.2.5	Tierexperimentelle Methoden	43

2.2.6	Studiendesign zum Nachweis einer Histon-induzierten Nierenschädigung	45
2.2.7	Studiendesign zum Einfluss von Histonen auf die Leukozytentransmigration	47
2.2.8	Studiendesign zur Wirkung von anti-Histon IgG bei akuter Nierenschädigung	48
2.2.9	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.10	Histologie	53
2.2.11	Statistische Auswertung	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Extrazelluläre Histone wirken zytotoxisch auf murine renale Zellen	59
3.1.1	Effekte extrazellulärer Histone auf murine glomeruläre Endothelzellen.....	59
3.1.2	Effekte extrazellulärer Histone auf murine tubuläre Epithelzellen.....	60
3.2	Extrazelluläre Histone aktivieren renale dendritische Zellen via TLR2 und TLR4....	61
3.3	Extrazelluläre Histone steigern die Leukozytendiapedese	62
3.4	Extrazelluläre Histone steigern die Expression inflammatorischer Zytokine.....	64
3.5	Extrazelluläre Histone induzieren morphologische Nierenschäden.....	67
3.5.1	Verminderte Nierenschädigung durch Histon-Inkubation mit APC	70
3.5.2	Verminderte Histon-induzierte Nierenschädigung bei <i>Tlr2/4</i> Knockout-Mäusen	70
3.6	Protektiver Effekt von anti-Histon IgG bei LPS-induzierter Nierenschädigung	71
3.6.1	Reduzierte morphologische Nierenschädigung durch anti-Histon IgG	71
3.6.2	Schutz vor Funktionsverlust der Niere durch anti-Histon IgG	73
3.7	Protektiver Effekt von anti-Histon IgG bei ischämischer Nierenschädigung	74
3.7.1	Reduzierte morphologische Nierenschädigung durch anti-Histon IgG	74
3.7.2	Reduzierte Expression inflammatorischer Zytokine durch anti-Histon IgG	76
4	Diskussion	79
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	89
7	Abkürzungsverzeichnis	100
8	Danksagung	104

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Akute Nierenschädigung

1.1.1 Epidemiologie, Definition und Klassifikation der akuten Nierenschädigung

Die akute Nierenschädigung ist ein komplexes Krankheitsbild, das die Prognose der betroffenen Patienten wesentlich beeinträchtigt. Nach einer multizentrischen Erhebung von mehr als 29 Millionen hospitalisierten Patienten beträgt die Prävalenz der akuten Nierenschädigung in den USA 1,9 % (1). Auf Intensivstationen sind entsprechend einer internationalen Studie mit 23 Ländern sogar durchschnittlich 5,7% der Patienten betroffen, wobei die Prävalenz zwischen 1% und 25% und die Mortalität zwischen 15% und 60% variiert (2). Das Auftreten einer akuten Nierenschädigung ist mit einem längeren Krankenhausaufenthalt und einer erhöhten Mortalität assoziiert. So ist laut einer Datenerhebung von Metnitz et al. die Mortalität Dialyse-pflichtiger Intensivpatienten viermal so hoch wie bei Intensivpatienten ohne Nierenersatztherapie (3). Die häufigste Ursache einer akuten Nierenschädigung auf Intensivstationen ist die Sepsis (2). Sepsis ist ein schwerer Krankheitszustand, der durch eine Entzündung des ganzen Körpers (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom, SIRS) und das Vorhandensein einer klinisch oder mikrobiell nachgewiesenen Infektion charakterisiert ist (4). Mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis kommt es zum Multiorganversagen, wobei die Niere fast immer betroffen ist (5). Wenn eine akute Nierenschädigung zusammen mit einer Sepsis auftritt steigt die Letalität auf bis zu 70% im Vergleich zu einer Letalität von 45% bei nicht-septischen Patienten (6).

Die epidemiologischen Daten zur akuten Nierenschädigung unterliegen u.a. auf Grund von Erhebungen in unterschiedlich ausgerichteten Kliniken starken Schwankungen und sind insbesondere auch deswegen schwer vergleichbar, weil sich bis vor kurzem keine einheitliche Definition der akuten Nierenschädigung durchgesetzt hatte. In einer internationalen Konsensuskonferenz wurden 2004 erstmals einheitliche Kriterien zur Schweregradeinteilung der akuten Nierenschädigung in Risiko, Schädigung, Versagen, Funktionsverlust und terminales Stadium der Niereninsuffizienz aufgestellt. Diese sog. RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss and End Stage Renal Disease) -Kriterien berücksichtigen die Höhe

des Anstiegs des Serum-Kreatinin-Spiegels, den relativen Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und die Menge der Urinausscheidung im Verlauf einer bestimmten Zeit (7). Im Jahre 2007 wurde in der Konferenz des Acute Kidney Injury Network (AKIN) die RIFLE Kriterien weiter modifiziert. Die AKIN-Kriterien (Stadium 1-3) berücksichtigen schon eine geringe Verschlechterungen des Serum-Kreatininwerts von >0.3 mg/dl innerhalb von 48 Stunden, während die GFR als Parameter entfällt. Das Endstadium ist nach diesen Kriterien erreicht sobald eine Nierenersatztherapie eingeleitet werden muss oder ein Nierenversagen entsprechend dem Kriterium RIFLE-F eintritt. Entsprechend diesem neuen Konzept wurde in der AKIN-Konferenz auch die bis dahin geläufige Bezeichnung „Akutes Nierenversagen“ (engl.: acute renal failure) erstmals durch den Begriff „akute Nierenschädigung“ (engl.: acute kidney injury, AKI) ersetzt (8). Daraus geht hervor, dass das eigentliche „Nierenversagen“ nicht mehr als Überbegriff betrachtet wird, sondern den Endpunkt eines breiten Kontinuums verschiedener Schweregrade der akuten Nierenfunktionsbeeinträchtigung vom Rückgang der Diurese über variabel ausgeprägte Anstiege des Serum-Kreatinins darstellt (9).

RIFLE-Kriterien

	GFR/ S.Kreatinin	Urinausscheidung
Risk/ Risiko	1,5-2-faches S.Kreatinin oder $> 25\%$ GFR-Abfall	$< 0,5$ ml/kg/h von 6-12 h
Injury/ Schädigung	2-3-faches S.Kreatinin oder $> 50\%$ GFR-Abfall	$< 0,5$ ml/kg/h über 12 h
Failure/ Versagen	> 3 -faches S.Kreatinin oder $> 75\%$ GFR-Abfall	$< 0,3$ ml/kg/h über 24 h oder Anurie über 12 h
Loss/ Verlust	Persistierendes Nierenversagen = Verlust der Nierenfunktion > 4 Wochen	
End stage/ Endstadium	Terminales Nierenversagen > 3 Monate	

AKIN / KDIGO-Kriterien

	S. Kreatinin	Urinausscheidung
Stadium 1	$\geq 1,5$ - bis 1,9-fach oder $\geq 0,3$ mg/dl	$< 0,5$ ml/kg/h von 6-12 h
Stadium 2	≥ 2 - bis 2,9-fach	$< 0,5$ ml/kg/h über 12 h
Stadium 3*	≥ 3 -fach oder ≥ 4 mg/dl	$< 0,3$ ml/kg/h über 24 h oder Anurie über 12 h

*Bei Einleitung einer Nierenersatztherapie ist Stadium 3 in jedem Fall erreicht

Abbildung 1: Schweregradeinteilung der akuten Nierenschädigung nach den RIFLE- (7), AKIN (8)- und KDIGO-Kriterien (10).

In zwei kürzlich publizierten Studien wurden diese neu modifizierten Kriterien an Hand von großen multizentrischen Studien in den USA (11) und Europa (12) validiert. Thakar und Kollegen stellten danach fest, dass ein zunehmender Schweregrad der akuten Nierenschädigung unabhängig von Komorbiditäten mit einem steigenden Anstieg des Mortalitätsrisiko verbunden ist (11). Joannidis und Kollegen konnten nachweisen, dass schon im Anfangsstadium der akuten Nierenschädigung (AKIN I bzw. RIFLE-R) die Sterblichkeit von Intensivpatienten signifikant erhöht ist (9, 12). Die internationale Organisation KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) hat sich die Aufgabe gestellt, die bisherige Nomenklatur und Beschreibung der Nierenschädigung nicht nur zu vereinheitlichen, sondern in allgemein gültige Empfehlungen umzusetzen. Die Empfehlungen der letzten KDIGO Konferenz zur akuten Nierenschädigung basieren auf der Datenlage bis 2011 und wurden im Jahre 2012 publiziert (10). Nach den aktuellen KDIGO-Leitlinien „akutes Nierenschädigung“ liegt demnach eine akute Nierenschädigung vor, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist: ein absoluter Anstieg des Serum-Kreatinins um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ innerhalb von 48 Stunden oder ein relativer Anstieg des Serum-Kreatinins auf das $\geq 1,5\text{-fache}$ (um $\geq 50\%$) des bekannten/ angenommenen Ausgangswertes innerhalb von 7 Tagen oder eine Urin-Ausscheidung von $< 0,5\text{ ml/kg Körpergewicht/h}$ für mindestens 6 Stunden. (10, 13).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der akuten Nierenschädigung

Der Entstehungsmechanismus der akuten Nierenschädigung wird klassischerweise in prärenale, intrarenale und postrenale Ursachen unterteilt. Dabei ist zu beachten ist, dass die Übergänge oft fließend verlaufen und gerade in der Intensivmedizin eine Kombination mehrerer Ursachen möglich ist. Am häufigsten ist die Nierenschädigung prärenalen Ursprungs. Hierbei reicht z.B. aufgrund eines reduzierten Herzminutenvolumens die renale Perfusion nicht mehr aus um die Aufrechterhaltung einer normalen GFR zu gewährleisten (14). Eine postrenal induzierte Nierenschädigung ist vergleichsweise selten und beruht auf einer Abflussstörung der ableitenden Harnwege, was zum Harnstau und schließlich zur eingeschränkten Nierenfunktion mit reduzierter GFR führt. Verantwortlich hierfür ist meist eine vergrößerte Prostata, seltenere Ursachen sind intra- und retroperitoneale Raumforderungen, ausgedehnte Harnwegskarzinome und neurologische Störungen. Ist der

Funktionsverlust der Niere allein prärenalen oder postrenalen Ursprungs und das Nierenparenchym selbst noch nicht geschädigt, so ist die Nierenfunktionsstörung bei rascher Behebung der Ursache reversibel. Bleibt jedoch eine zeitnahe, adäquate Therapie aus, so ist ein Übergang in eine intrarenale Schädigung die Folge (14, 15). Die direkte, intrarenale Nierenschädigung ist teils irreversibel. Nach der betroffenen Struktur werden die akute, meist rapid progressive Glomerulonephritis, die akute interstitielle Nephritis, die akute Tubulusnekrose, sowie mikro- und makrovaskuläre Erkrankungen unterschieden (15, 16). Obwohl in den meisten Fällen die letztlich beweisende Biopsie ausbleibt, gilt die akute Tubulusnekrose als häufigste Ursache der akuten, intrarenalen Schädigung. Zwei Drittel der Fälle von nachgewiesener akuter Tubulusnekrose werden durch renale Ischämie/Reperfusionsschäden oder Sepsis verursacht. Weitere häufige Ursachen einer akuten Tubulusnekrose sind indirekte oder direkte Nephrotoxine. Bezüglich nephrotoxischer Substanzen werden exogen zugeführten Auslöser wie Medikamente (z.B. Cisplatin), Schwermetalle (z.B. Cadmium) und Röntgenkontrastmittel von endogenen Schäden durch Hämolyse, Rhabdomyolyse und Hyperurikämie unterschieden. Das bei Sepsis auftretende akute Nierenversagen ist eine Kombination aus toxischen Prozessen und einer reduzierten Perfusion der Niere im Rahmen eines septischen Schocks (15).

1.1.3 Tiermodelle der akuten Nierenschädigung

Tierversuche sind zum Verständnis der Pathophysiologie und zur Entwicklung von Therapeutika bei akuter Nierenschädigung von essentieller Bedeutung. Idealerweise sollte ein Tiermodell so gewählt werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden können. Versuche mit Mäusen sind beliebt, da diese vergleichsweise günstig, klein und leicht zu halten sind. Außerdem sind Immunsystem und Genetik der Maus sehr gut charakterisiert und es stehen zahlreiche transgene Varianten wie Knockout-Mäuse zur Verfügung. Allerdings bestehen immunologische Differenzen zwischen Mäusen und Menschen wie etwa die zum Teil unterschiedlichen Toll-like Rezeptoren (17, 18). Die meisten Tierversuche werden zudem mit jungen, gesunden Mäusen durchgeführt. Diese Konstellation unterscheidet sich von dem Großteil der niereninsuffizienten Patienten in Industrieländern, die überwiegend älter und multimorbide sind (17).

Maus-Modelle der ischämisch-induzierten akuten Nierenschädigung

Ischämie ist eine der häufigsten Ursachen der akuten Nierenschädigung beim Menschen (14). Im Tiermodell werden renale Ischämie- und Reperfusionsschäden durch Abklemmung einer oder beider Nierenarterien induziert, um Erkenntnisse zur Pathophysiologie der akuten ischämischen Nierenschädigung zu gewinnen und mögliche therapeutische Ansätze zu testen. Hierbei werden aufgrund ihrer geringen Größe und der Vielzahl verfügbarer transgener Varianten ebenfalls überwiegend Mäuse als Versuchstiere verwendet. Meist wird die bilaterale Nierenarterienabklemmung der unilateralen vorgezogen, da ischämische Nierenschädigungen auch beim Menschen in der Regel nicht auf eine Niere beschränkt sind (19).

Maus-Modelle der septisch-induzierten akuten Nierenschädigung

Zu den drei geläufigsten Maus-Modellen der Sepsis gehören die polymikrobielle Sepsisinduktion durch operative Schädigung der endogenen Schutzbarriere des Darms, die exogene Infektion durch intravenöse oder intraperitoneale Applikation spezifischer Bakterien und die Endotoxin-induzierte Sepsis durch LPS-Injektion (20). Jedes der genannten Modelle hat unterschiedliche Vor- und Nachteile. Die bekanntesten operativen Sepsis-Modelle der Maus sind zum einen die Ligatur und Punktion des Coecums (Cecal Ligation and Puncture, CLP) mit konsekutiver multimikrobieller Bakteriämie durch Übertritt von Faecesinhalt in das Peritoneum (21) und zum anderen die Induktion einer Peritonitis durch Implantation eines Stent in das Colon ascendens, welcher Darmlumen und Peritoneum verbindet (Colon Ascendens Stent Peritonitis, CASP) (20). CLP ist derzeit das am häufigsten verwendete Sepsis-Modell (22). Es imitiert die humane Sepsis am ehesten, da nicht von exogenen Pathogenen appliziert werden müssen. Das Zytokinprofil des CLP-Modells weist stärkere Parallelen zur humanen Sepsis auf als das des LPS-Modells (23). Allerdings bleibt beim CLP-Modell eine Beteiligung der Niere oftmals aus (20, 23). Somit eignet sich das CLP-Modell nicht zur reproduzierbaren Induktion einer septischen akuten Nierenschädigung. Die Sepsisinduktion durch Infusion von Bakterien eignet sich zum kontrollierten und reproduzierbaren Studium der durch ein bestimmtes Pathogen induzierten Sepsis. Aufgrund der starken Pathogen-Spezifität unterscheidet sich die Pathophysiologie der Modelle

untereinander entsprechend des verwendeten Bakteriums sehr. Dieses Sepsis-Modell spielt bezüglich der akuten Nierenschädigung eine untergeordnete Rolle (20).

Die Endotoxin-induzierte Entzündung ist ebenfalls ein häufig angewandtes Sepsis-Modell. Durch Infusion von LPS, einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien wird eine systemische Inflammation verursacht, die zahlreiche klinische und immunologische Merkmale der humanen Sepsis imitiert. Allerdings bleibt im LPS-Modell die Bakteriämie aus und es ist verglichen zur humanen Sepsis ein früherer und höherer Zytokinanstieg nachweisbar (23). Während in Tierversuchen mit LPS-induzierter Entzündung die Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNF- α die Überlebenswahrscheinlichkeit verbessert (24), blieb in klinischen Studien mit septischen Patienten ein positiver Effekt durch die Behandlung mit anti-TNF- α aus (25). Durch eine systemische LPS-Injektion kann eine akute Nierenschädigung induziert werden. Die Applikation von LPS führt zu einem Abfall der GFR und zur renalen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten (26). Das LPS-Sepsismodell hat den Vorteil, dass mit einer niedrigen Dosis von LPS die systemischen und renalen Veränderungen in Frühstadien einer Sepsis simuliert werden ohne dass schwerwiegende hämodynamische Veränderungen auftreten (20, 27). LPS-Injektion ist daher ein beliebtes Modell zur Erforschung der septischen akuten Nierenschädigung.

Maus-Modell der einseitigen endothelialen Nierenschädigung

Die Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Bernd Hohenstein und Prof. Dr. Christian Hugo hat ein murines Modell für eine einseitige endotheliale Schädigung der Niere entwickelt. Bei diesem Modell wird über eine selektive Nierenarterienperfusion mit dem Lektin Concanavalin A (Con-A) und nachfolgende Perfusion mit anti-Con-A ein spezifischer mikrovaskulärer Schaden gesetzt, bei dem es zu schweren akuten glomerulären und peritubulären Thrombosen mit Tubulusnekrosen kommt. Mit dieser Methode können Endothelschädigungen und Reparaturmechanismen erforscht werden. Da die Nierenschädigung nur unilateral erfolgt, eignet sich die kontralaterale Niere als interne Kontrolle (28). In der vorliegenden Arbeit diente dieses Modell der unilateralen Nierenarterienperfusion als Methode zur Erforschung der Nierenläsionen durch extrazelluläre Histone.

1.1.4 Interventionen zur Prophylaxe der akuten Nierenschädigung

Jede akute Nierenschädigung verschlechtert die Prognose eines Patienten dramatisch. So ergab eine retrospektive Analyse von 82.711 Patienten eine Steigerung der Langzeitmortalität mit zunehmendem Schweregrad der initialen Nierenschädigung (29). Zwar wurde durch die Einführung der Hämodialyse die Letalität der akuten Nierenschädigung von zuvor 90% fast um die Hälfte reduziert, aber seit damals konnten trotz größter Bemühungen keine weiteren Erfolge erzielt werden (30). Daher sind Maßnahmen der Nephroprotektion von großer klinischer Bedeutung.

Neben einer adäquaten Volumensubstitution zur Verbesserung der Hämodynamik und Aufrechterhaltung der Nierenperfusion, wurden zahlreiche medikamentöse Ansätze zur Prävention und Therapie der akuten Nierenschädigung erprobt. Weil die nicht-oligurische Nierenschädigung in der Regel eine besser Prognose hat als die oligurische, hatte man lange Zeit angenommen, dass die präventive Verabreichung von Schleifendiuretika den Übertritt in die oligurische Phase verhindern und dadurch die Prognose verbessern würde (31). Allerdings ergab eine große Meta-Analyse aus insgesamt 9 prospektiven randomisierten klinischen Studien, dass Schleifendiuretika keinen Einfluss auf den Verlauf der akuten Nierenschädigung haben. Durch den Einsatz von Furosemid wurde weder die Nierenfunktion verbessert, noch die Mortalität gesenkt, sondern es wurden vielmehr Nebenwirkungen wie Taubheit und Tinnitus beobachtet (32). Eine retrospektive Analyse hat sogar gezeigt, dass Furosemid bei Intensivpatienten die Dauer der akuten Nierenschädigung verlängert und die Letalität erhöht (33). Aufgrund dieser Datenlage wird in den KDIGO-Leitlinien „akute Nierenschädigung“ von 2012 von der präventiven Gabe von Diuretika abgeraten (10). Ein weiterer viel erprobter therapeutischer Ansatz zur Vorbeugung einer akuten septischen Nierenschädigung ist die medikamentöse Induktion einer renalen Vasodilatation durch atriales natriuretisches Peptid (ANP), Dopamin, Theophyllin oder Endothelin-Antagonisten. Nach vielversprechenden Ergebnisse in tierexperimentellen Studien ist allen genannten Substanzen gemein, dass ihre nephroprotektive Wirkung in der klinischen Anwendung beim Menschen nicht bestätigt werden konnte (30, 34). Entsprechend den aktuellen KDIGO-Leitlinien wird die Gabe von Dopamin und ANP sowohl zur Prävention, als auch zur Therapie der akuten Nierenschädigung ausdrücklich nicht mehr empfohlen (10). Im Jahr 2000 wurde erstmals in einer vielversprechenden klinischen Studie eine signifikante Reduktion

Kontrastmittel-induzierter Nierenschädigungen durch die prophylaktische Anwendung des Sauerstoffradikalfängers N-Acetylcystein beschrieben (35). Als Substrat der Gluthation-Synthese besitzt N-Acetylcystein eine starke antioxydative und entzündungshemmende Wirkung. Außerdem konnte in Tierexperimenten nachgewiesen werden, dass N-Acetylcystein zu einer Verbesserung des medullären Blutflusses führt (36). Die nephroprotektiven Effekte von N-Acetylcystein wurden daraufhin in zahlreichen weiteren klinischen Studien überprüft, wobei die Ergebnisse äußerst heterogen ausfielen. Während in einer Meta-Analyse von Kelly und Kollegen (37) die Wirksamkeit zur Prävention der Kontrastmittel-Nephropathie bestätigt wurde, zeigten andere Studien keine protektiven Effekte (38). Die endgültige Beurteilung der Datenlage wird durch die meist geringe Zahl von eingeschlossenen Patienten erschwert. Nur eine einzige klinische Studie vergleicht die prophylaktische Anwendung von N-Acetylcystein mit einer Placebo-Gabe bei Intensivpatienten. Es wurden dabei weder signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens einer akuten Nierenschädigung, noch der Mortalität nachgewiesen (39).

Der septische Schock ist die häufigste Ursache einer akuten Nierenschädigung auf Intensivstationen (2). Zur Prävention einer Nierenschädigung ist eine Optimierung der Hämodynamik in der Frühphase der Sepsis von entscheidender Bedeutung. Dementsprechend haben Studien belegt, dass das Risiko im Rahmen einer Sepsis ein Multiorganversagen und insbesondere eine akute Nierenschädigung zu entwickeln durch eine kreislauf-stabilisierende Therapie mit adäquater Volumensubstitution gesenkt wird (40, 41). Es wurden zahlreiche Ansätze zur Therapie der Sepsis erprobt. Aktiviertes Protein C (APC) war als Arzneimittel zur Behandlung der schweren Sepsis zugelassen. Jedoch wurde es 2011 vom Markt genommen, nachdem eine Cochrane Analyse ergab, dass APC bei Patienten mit schwerer Sepsis keine Reduktion der Letalität bewirkt und das Blutungsrisiko erhöht (42). Zahlreiche, hier nicht beschriebene Therapieversuche zur akuten Nierenschädigung haben leider ergeben, dass es zwischen den tierexperimentell nachweisbaren positiven Effekten und der therapeutischen Anwendung beim Menschen große Unterschiede gibt. Dies liegt wahrscheinlich zum Teil daran, dass beim Tierexperiment eine prophylaktische Gabe von Substanzen möglich ist während neue Therapien beim Menschen in der Regel erst bei einem schon voll ausgeprägten akuten Nierenversagen eingesetzt werden.

1.2 Immunsystem

1.2.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes Abwehrgefüge zum Schutz des Organismus vor Pathogenen. Traditionell wird zwischen dem phylogenetisch älteren sog. „angeborenen“ und dem phylogenetisch jüngeren, „erworbenen“ Immunsystem unterschieden. Eine Aktivierung des Immunsystems schließt zelluläre und humorale Komponenten ein und führt zu einer Entzündungsreaktion, die im Idealfall koordiniert aufgebaut wird, zu einer Elimination des Pathogens führt und dann wieder abgebaut wird (43).

Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist allen vielzelligen Organismen gemein und stellt die erste Linie der körpereigenen Abwehr dar. Oberflächenepithelien von Haut, Schleimhäuten, Darmwand und Lunge fungieren u.a. als natürliche Barrieren, die auch antimikrobielle Peptide sezernieren und so Pathogene abtöten. Molekulare Grundmuster von Pathogenen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) werden durch in der Evolution konservierte Keimbahn-kodierte Rezeptoren erkannt. Mit Hilfe dieser Mustererkennung-rezeptoren (pattern recognition receptors; PRR) wird die rasche Elimination potentieller Erreger eingeleitet. Diese erfolgt sowohl durch eine Vielzahl zellulärer Bestandteile wie Makrophagen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen, Granulozyten und dendritische Zellen, als auch durch humorale Abwehrmechanismen wie der Wirkung von Zytokinen und der Aktivierung von Plasmaproteinen des Komplementsystems (44, 45).

Das erworbene Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das erworbene Immunsystem spezifisch angelegt und es ist in der Lage, nach einem ersten Kontakt mit einem Antigen ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, das es befähigt, bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen schneller und heftiger zu reagieren. Die Spezifität des erworbenen Immunsystems basiert auf antigenspezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten und deren Kopplung mit den für das entsprechende Individuum spezifischen Antigenen des MHC (Major Histocompatibility Complex) (43).

Kooperation zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem

Das angeborene und das erworbene Immunsystem kooperieren in vielfältiger Weise, wodurch die Effizienz des Systems wesentlich gesteigert wird. Diese Kooperation wird durch zelluläre und humorale Faktoren bewerkstelligt. Beispielsweise sind Makrophagen und dendritische Zellen in der Lage, als Bestandteile des angeborenen Immunsystems Bakterien oder Viren als „fremd“ zu erkennen und direkt zu phagozytieren. Makrophagen und dendritische Zellen können allerdings auch Antigene aufnehmen, prozessieren und im Kontext mit MHC-Antigenen den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. In verschiedenen Stadien der Immunreaktion können diese Zellen unterschiedliche Antigene an ihrer Oberfläche exprimieren und unterschiedliche Zytokine sezernieren, die ihrerseits wichtige Signale zwischen verschiedenen Immunzellen und somatischen Zellen übermitteln und so ein koordiniertes Zusammenspiel bei der Entzündungsreaktion gewährleisten (45). Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ und die Toleranz gegenüber dem „Selbst“ wie es lange Zeit als Grundvoraussetzung des intakten Immunsystems propagiert wurde, genügt jedoch nicht um zu erklären warum auch die Zellschädigung ohne exogenen Erreger das Immunsystem stimuliert und eine sog. „sterile Entzündung“ auslöst. Das bisherige Konzept muss demnach um eine weitere Dimension erweitert werden: der Unterscheidung von „gesundem-Selbst“ und „verändertem-Selbst“ (46).

1.2.2 Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem

Charles Janeway postulierte 1989 erstmals, dass das angeborene Immunsystem nicht auf alle körperfremden Antigene reagiert, sondern lediglich auf Antigene, die mit der potentiellen Gefahr einer Infektion verbunden sind. Diese Unterscheidung zwischen harmlosen Fremdanitigenen und Krankheitserregern erfolgt durch Rezeptoren, die charakteristische Strukturmoleküle von Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen und daraufhin eine Immunantwort auslösen. Die hoch konservierten Keimbahn-Rezeptoren werden analog als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) bezeichnet (47).

Die „Danger-Hypothese“

Pathogene sind nicht die einzige Ursache für eine Gewebs- oder Zellschädigung. Diese kann beispielsweise auch durch Trauma, Chemikalien, Ischämie, exzessive Hitze oder Kälte auftreten, was eine nicht-infektiöse Entzündungsreaktion des Körpers auslösen kann und dann als „sterile Entzündung“ bezeichnet wird (48, 49). Entsprechend dieser Beobachtung formulierte Polly Matzinger 1994 die „Danger Hypothese“ (50). Demnach sind nicht nur Infektionen, sondern Zellschädigungen jeglicher Ursache ein universelles Zeichen von potentieller Gefahr. Nach der „Danger-Hypothese“ werden endogene Bestandteile von sterbenden Zellen in den Extrazellularraum freigesetzt und dienen als Warnsignale/ Gefahrensignale („Danger Signals“). Diese besitzen analog den PAMPs spezielle molekulare Muster, sog. „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), die ebenfalls von speziellen Rezeptoren erkannt werden und eine sterile Entzündungsreaktion auslösen (48). Während früher angenommen wurde, dass nur nekrotische Zellen DAMPs freisetzen, ist heute bekannt, dass auch in Apoptose befindliche Zellen solche Signale auslösen können (51).

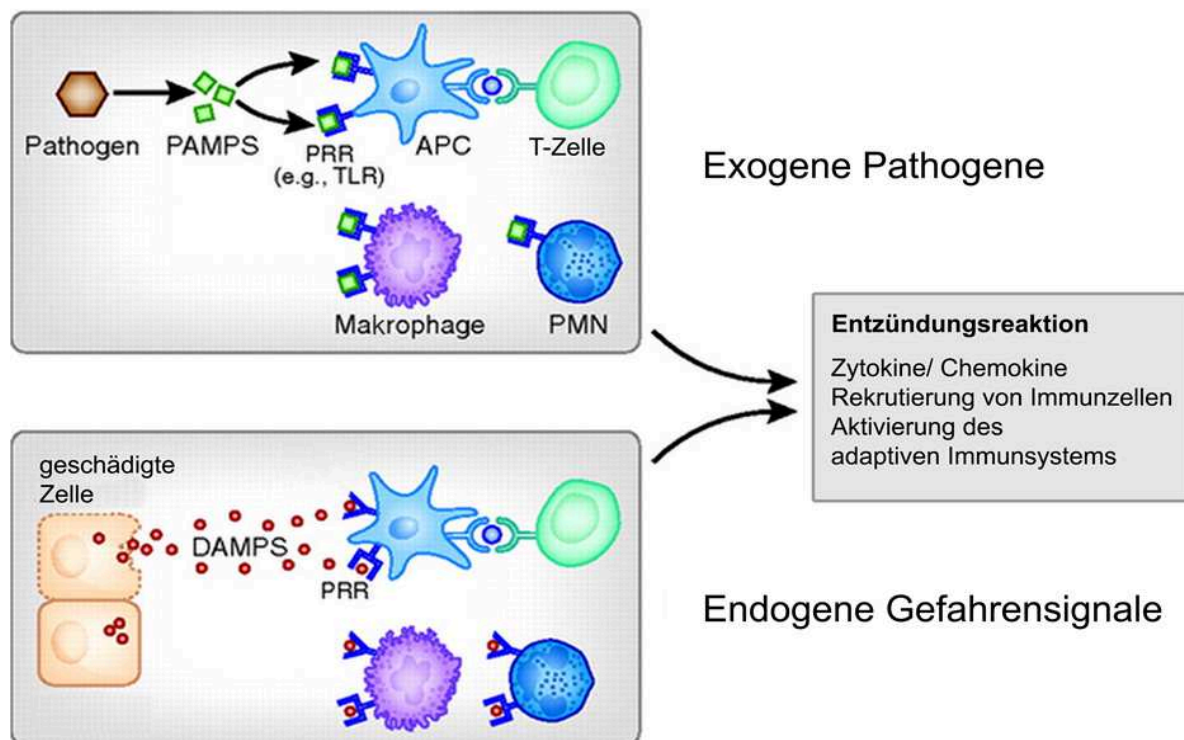


Abbildung 2: Mustererkennung der angeborenen Immunität

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) und DAMPs (damage-associated molecular patterns) aktivieren teils identische Mustererkennungsrezeptoren (pathogene recognition receptors, PRRs) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie auf polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) und tragen so zur Induktion der Entzündungsreaktion bei. Abbildung modifiziert aus (52).

Entsprechend der aktuellen Einteilung von Kaczmarek et al. (53) werden zwei Gruppen von DAMPs unterschieden: Einerseits sind dies Moleküle, welche in intakten, lebenden Zellen Funktionen ausüben, die nicht mit dem Entzündungsprozess assoziiert sind, aber nach Zellschädigung und Freisetzung in den Extrazellularraum als DAMPs erkannt werden und immunstimulatorische Eigenschaften entwickeln. Beispiele hierfür sind High-Mobility-Group-Box 1 (HMGB1), Hitzeschockproteine (Hsp), Adenosintriphosphat (ATP) und Harnsäure (54). Dem gegenüber steht eine Gruppe von DAMPs, die als Alarmine (engl. alarmins) bezeichnet wird. Dies sind Moleküle mit Zytokin-ähnlichen Eigenschaften, die in Zellen gespeichert und bei Zelllyse freigesetzt werden, wodurch sie zur entzündlichen Immunantwort beitragen. Beispiele für Alarmine sind Interleukin-1 α oder Interleukin-33 (55).

Die Gemeinsamkeit der Pathogen-induzierten Immunantwort und der nicht-entzündlichen Immunantwort auf Zellschaden und Zelltod wird dadurch verdeutlicht, dass sowohl PAMPs, als auch DAMPs oft an die gleichen Mustererkennungsrezeptoren binden (53). Diese Bindung induziert die Aktivierung verschiedener Effektormechanismen des Immunsystems. Im Idealfall führt diese Immunreaktion zu einer koordinierten Eliminierung des Pathogens und der geschädigten Zellen. Kommt es jedoch zu einer überschießenden Immunreaktion wird eine Entzündungskaskade ausgelöst, welche die ursprüngliche Schädigung zusätzlich verstärkt und sich im schlimmsten Fall als SIRS auf den gesamten Organismus ausbreitet (17).

Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Zur Familie der PRRs gehören Toll-like Rezeptoren (TLRs), RIG-I-like Rezeptoren (RLRs), NOD-like Rezeptoren (NLRs) und C-Typ Lectin Rezeptoren (CLRs) (53). Im folgenden Abschnitt werde ich entsprechend meiner experimentellen Arbeit ausschließlich auf Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden eingehen.

Toll-like Rezeptoren sind die am besten erforschten PRRs. Der Name der gesamten Toll-like-Rezeptor-Familie wurde 1996 von der Forschungsgruppe um Christiane Nüsslein-Volhard geprägt, die den ersten PRR durch den Nachweis identifizierte, dass die Mutation eines Rezeptorproteins, des sog. „Toll-Protein“ in mutierten *Drosophila melanogaster* Fliegen für deren Abwehrschwäche gegen Pilzinfektionen verantwortlich ist (56). In den darauffolgenden Jahren wurden 12 murine TLRs (TLR 1-9, TLR11, TLR13) und 10 humane

TLRs (TLR 1-10) identifiziert, wobei TLR10 aufgrund einer Stoppmutation des Mausgenoms nicht in Mäusen, sondern nur beim Menschen exprimiert wird. TLR-11, -12 und -13 wurden dahingegen nur in Mäusen und nicht beim Menschen nachgewiesen. Da die Toll-like Rezeptoren 1- 9 sowohl in Menschen, als auch in Mäusen konserviert sind, wurden diese am besten charakterisiert und erforscht. Toll-like-Rezeptoren sind Typ-1 Transmembran-Proteine, die sich aus drei Haupt-bestandteilen zusammensetzen: (1) einer Ektodomäne mit einer Leucin-reichen Sequenz (leucin rich repeats, LRR), welche an der Mustererkennung von DAMPs und PAMPs beteiligt ist, (2) einer Transmembrandomäne und (3) einer intrazellulären Domäne, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit der Interleukin-1 Rezeptor-Familie als Toll/Interleukin-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) bezeichnet wird und zur nachgeschalteten Signaltransduktion beiträgt (57, 58). Anhand ihrer Lokalisation werden zwei Subgruppen von Toll-like Rezeptoren unterschieden: Die ausschließlich in intrazellulären Bestandteilen wie Endosomen, Lysosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum exprimierten TLR-3,-7,-8 und -9 leiten durch die Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren vor allem die anti-virale Immunantwort ein. Die auf der Zelloberfläche exprimierten TLR-1, -2, -4, -5, -6 und -11 erkennen mikrobielle Komponenten wie Lipide, Lipoproteine und Proteine von Pilzen, Viren, Bakterien und Protozoen, sowie endogene Moleküle (45, 58).

Ein wichtiger Ligand des TLR4 ist das Lipopolysaccharid (LPS) (59). LPS ist ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und als Verursacher des septischen Schocks bekannt. Es wird häufig zur experimentellen Auslösung einer Endotoxin-induzierten Sepsis verwendet (44). Die Schlüsselrolle von TLR4 im LPS-induzierten Sepsismodell wurde erstmals von Poltorak und Kollegen belegt, indem sie die bekannte LPS-Resistenz von C3H/HeJ Mäusen auf eine Mutation des *Tlr4* Gens zurückführten (59). TLR4 bildet zusammen mit MD2 (myeloid differentiation factor 2) einen Komplex auf der Zelloberfläche, der an LPS bindet. Jeweils zwei solcher TLR4-MD2-LPS- Komplexe lösen die Signaltransduktion zur Rekrutierung intrazellulärer Adaptormoleküle aus und leiten so weitere Entzündungsprozesse ein (60).

Zahlreiche endogene Moleküle wie Hitzeschockproteine (Hsp-22, -60 und -70), modifiziertes Low Density Lipoprotein (LDL), Hyaluronsäure und High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) haben bei Freisetzung in den Extrazellularraum durch Zellschäden oder Zelltod das Potential

TLR-vermittelte Signalwege zu aktivieren. Hierbei wird insbesondere die Bindung endogener Moleküle an TLR2 und TLR4 beschrieben, welche über eine gesteigerte Expression inflammatorischer Zytokine, wesentlich an der Entstehung und Verstärkung der sterilen Entzündung beteiligt sind (45, 48).

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (45, 53)

Rezeptor	Adaptor	PAMPs	DAMPs
TLR1	MyD88, TIRAP	Triacy-Lipopeptide	
TLR2	MyD88, TIRAP	Lipoprotein	HMGB1, HSPs
TLR3 (endosomal)	TRIF	virale/ bakterielle DNA	mRNA, Ribonukleoproteine
TLR4	MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM	LPS	HMGB1, HMGN1, HSPs, Hyaluronsäure, Biglycan, Heparinsulfat
TLR5	MyD88	Flagellin	
TLR6	MyD88	Diacyl-Lipopeptide	U1 snRNP
TLR7, TLR8 (endosomal)	MyD88	virale/ bakterielle ssRNA	U1 snRNP
TLR9 (endosomal)	MyD88	virale/ bakterielle DNA	mtDNA, HMGB1
TLR11 (endosomal)	MyD88	Profilin-like Molekül	

Abkürzungen (s. auch Abk.-Verzeichnis): TLR: Toll-like Rezeptor; dsRNA: Doppelsträngige RNA; ssRNA: Single stranded (einzelssträngige) RNA; mRNA: messenger RNA; mt DNA: mitochondriale DNA; TIR: Toll/Interleukin-1 Rezeptor; TIRAP: TIR-containing adaptor protein; TRAM: TRIF-related adaptor molecule; TRIF: TIR containing adaptor-inducing Interferon β ; MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88; LPS: Lipopolysaccharid; HMGB High-mobility group box; HSP: heat shock protein

Intrazelluläre Signalwege bei Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die TLR-vermittelte Signaltransduktion ist abhängig von der Interaktion der TIR-Domäne mit verschiedenen Adaptormolekülen wie MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR-domain containing adaptor-inducing Interferon β), TIRAP (TIR containing adaptor protein) und TRAM (TRIF related adaptor molecule), die wiederum

Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor κ B), IRF3/7 (Interferon regulatory factors 3/7) und MAP Kinasen (mitogen-activated protein kinases) aktivieren (45, 57, 61). Dabei sind zwei Signalwege bekannt: der MyD88-abhängige und der TRIF-abhängige Signalweg. Über den MyD88-Signalweg erfolgt letztlich die Aktivierung von NF- κ B, wodurch die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und dendritische Zellen induziert wird, während über den TRIF-abhängigen Signalweg zusätzlich IRF3 aktiviert und so die Ausschüttung von Typ-1 Interferonen eingeleitet wird. Alle Toll-like Rezeptoren außer TLR3 rekrutieren MyD88 und leiten den MyD88-abhängigen Signalweg ein. Zur Induktion des MyD88-abhängigen Signalweges rekrutieren TLR-1, -2, -4 und -6 zusätzlich zu MyD88 das Adaptormolekül TIRAP. Lediglich TLR3 und TLR4 initiieren den TRIF-abhängigen Signalweg. TLR-4 rekrutiert dabei zusätzlich zu TRIF das Adaptormolekül TRAM. Somit nimmt TLR4 eine Sonderstellung ein, da dieser Rezeptor als einziger alle vier Adaptormoleküle (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) rekrutiert und sowohl den MyD88-, als auch den TRIF-abhängigen Signalweg einleitet (57).

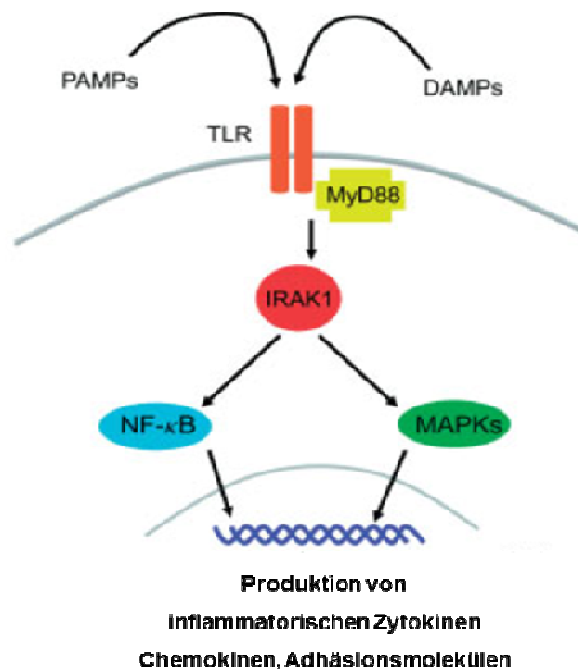


Abbildung 3: Schematische Darstellung des MyD88-abhängigen TLR-Signalwegs, modifiziert aus (63)

PAMPs und DAMPs aktivieren über Toll-like Rezeptoren MyD88-abhängige Signalwege, wodurch letztlich die gesteigerte Expression inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle induziert wird.

Abkürzungen: TLR: Toll-like Rezeptor; PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns; DAMPs: Danger-associated molecular patterns; MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; IRAK1: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

1.2.3 Inflammatorische und chemotaktische Zytokine

Zytokine gehören zu einer weitläufigen Familie von 6-51 kDa großen Polypeptid-Signalmolekülen, die von verschiedenen Zellen als Antwort auf unterschiedliche aktivierende Stimuli wie Endotoxine, Ischämie-Reperfusionsschäden, disseminierte intravasale Koagulopathie, Anaphylaxie und direkte Zellplasmamembrantraumata freigesetzt werden und durch die Bindung an spezifische Rezeptoren sowohl autokrin als auch parakrin und/oder endokrin wirksam sind (62).

In dieser Arbeit sind die sog. inflammatorischen Zytokine von besonderem Interesse. Der Entzündungsprozess beinhaltet die Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Pro-inflammatorische Zytokine stimulieren lokal die Leukozytenproliferation, Zytotoxizität, Prostaglandinsynthese und die Ausschüttung von proteolytischen Enzymen. Als systemische Wirkung verursachen pro-inflammatorische Zytokine u.a. Fieber. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 haben das Ziel, den Entzündungsprozess lokal zu begrenzen und eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Der Verlust dieser Kontrollfunktion und eine Überexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen führt zur systemischen Entzündung mit potentiell verheerenden Folgen einschließlich des SIRS, Multiorganversagens (Multi-Organ Dysfunction, MODS), Schock und Tod (62). So ist die Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 und MIP-1 α im Rahmen eines Entzündungsprozesses bei schweren Läsionen regelmäßig mit einer hohen Mortalität verbunden (63-65). Inflammatorische Zytokine werden kaskadenartig freigesetzt. Zunächst werden TNF α und IL-1 β ausgeschüttet, die dann die Synthese weiterer Zytokine wie IL-6 stimulieren (66). IL-6 wird oft aufgrund seiner oben beschriebenen Assoziation mit TNF α den pro-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet, obwohl es auch anti-inflammatorische Eigenschaften wie die Herunterregulierung der Synthese von IL-1 und TNF α besitzt und so die Entzündungsreaktion eindämmt (67).

Bei der Entzündungsreaktion spielen chemotaktische Zytokine, sog. Chemokine eine Schlüsselrolle, da sie die Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsherd vermitteln. Unter anderem ermöglichen Chemokine die Diapedese von Leukozyten aus dem Blutstrom in das Interstitium (68). Zytokine und Chemokine sind somit essentielle Faktoren für das koordinierte Zusammenspiel der verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems.

1.2.4 Spezielle Rolle der Leukozyten bei Entzündungsreaktionen

Leukozyten sind auf vielfältige Weise an Entzündungsreaktionen beteiligt. Während B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zugeordnet werden, sind Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und (neutrophile, eosinophile, basophile) Granulozyten Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend die Rolle neutrophiler Granulozyten und dendritischer Zellen bei der akuten Nierenschädigung untersucht, weshalb auf diese im Anschluss gesondert eingegangen wird.

Rekrutierung und Diapedese von Leukozyten

Die Leukodiapedese beruht auf einer komplexen Interaktion zwischen dem Endothel postkapillärer Venolen und den Leukozyten. Ruhendes Endothel interagiert kaum mit Leukozyten des Blutstroms. Eine lokale Zellschädigung führt zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Diese leiten die chemotaktische Rekrutierung der Immunzellen und die Aktivierung des Endothels ein. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule 1), welche zusammen mit leukozytären Integrinen die Leukozytenadhäsion und -transmigration begünstigen (69).

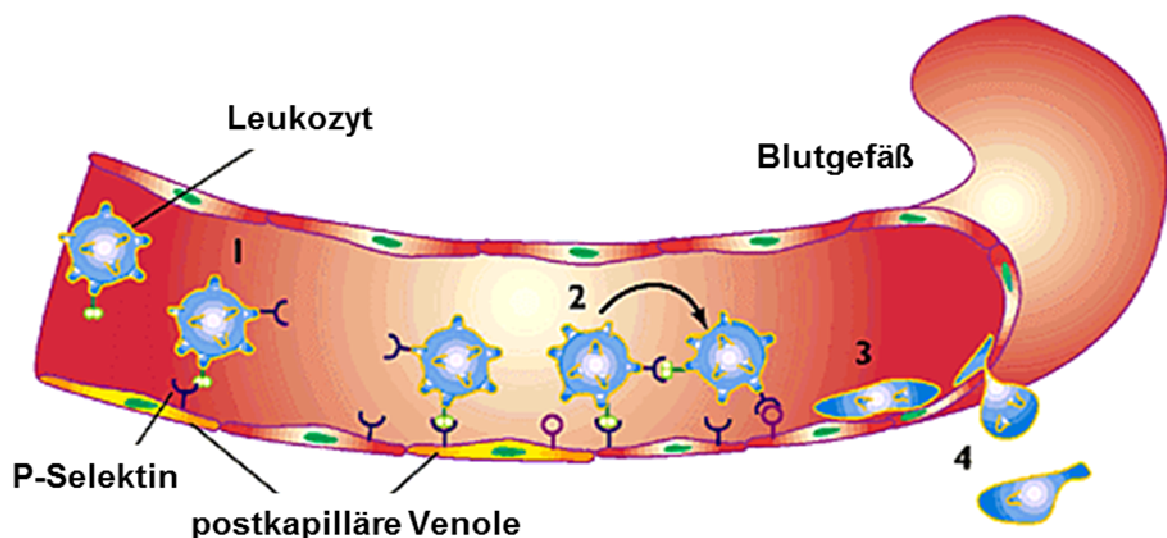


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Leukodiapedese in postkapillären Venolen (70)

(1) Aktivierung von P-Selektin (2) Leukozytenrollen (3) Integrin-vermittelte Adhäsion (4) Transmigration

Neutrophile Granulozyten und Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Neutrophile Granulozyten sind Schlüsselfiguren des angeborenen Immunsystems. Sie stellen die erste Verteidigungslinie gegen Bakterien und andere Krankheitserreger dar, indem sie durch Chemokine innerhalb kürzester Zeit aus dem Blutstrom an den Ort der Entzündung rekrutiert werden. Bis vor kurzem waren lediglich zwei Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten bekannt: (1) Die Phagozytose, wobei die Mikroorganismen von den Neutrophilen aufgenommen, in Vesikel eingeschlossen und lysosomal verdaut werden und (2) die Degranulation, bei der neutrophile Granulozyten antimikrobielle Substanzen freisetzen (71).

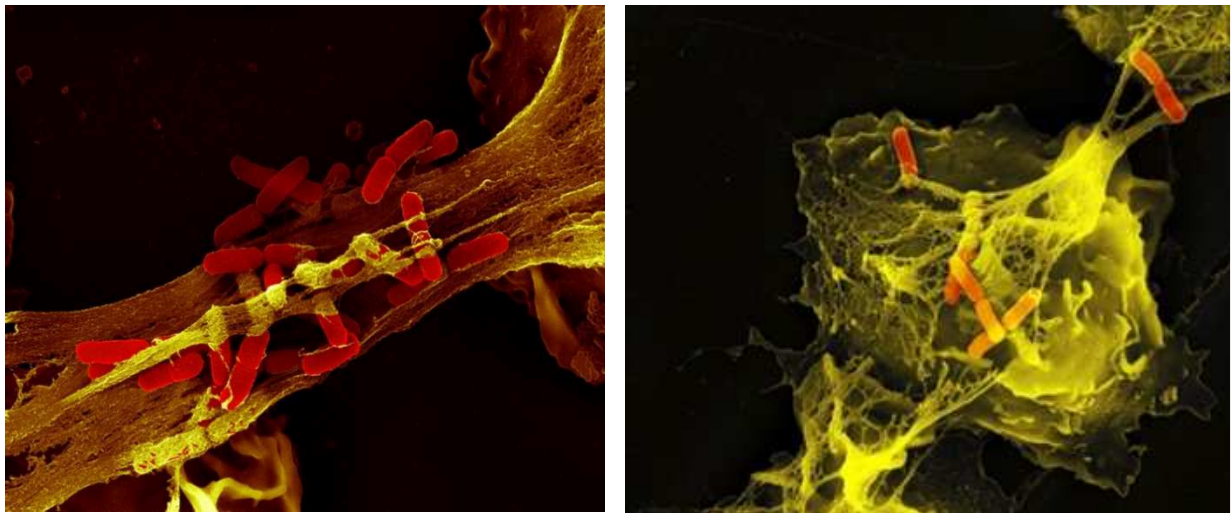


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Stimulierter neutrophiler Granulozyt mit Netzen und darin gefangenen Shigellen (orange).

Fotos mit freundlicher Erlaubnis von Volker Brinkmann aus <http://www.mpg.de/276329/NETs?seite=1>

2004 wurde ein dritter Abwehrmechanismus identifiziert: Unter dem Raster-Elektronenmikroskop entdeckte die Arbeitsgruppe von Arturo Zychlinsky erstmals, dass neutrophile Granulozyten faserige Strukturen in den Extrazellularraum freisetzen, sog. Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Diese fibrilläre Matrix aus zytoplasmatischen Granula-Proteinen, entwirrttem Chromatin und Histonen spannt sich wie ein Netz um die Pathogene und verhindern so eine weitere Ausbreitung. Durch die hohe Konzentration der aus den Neutrophilen ausgeschütteten antimikrobieller Substanzen wird so eine effiziente extrazelluläre Bekämpfung potentieller Krankheitserreger eingeleitet (72). Die Freisetzung von NETs erfolgt als Immunantwort auf pro-inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-8 und TNF α (72) und konnte bereits bei Exposition mit zahlreichen pathogenen Bakterien (72-74), Pilzen

(74, 75) und Protozoen (76) nachgewiesen werden. Die Bildung der NETs bedeutet gleichzeitig den Zelltod der neutrophilen Granulozyten. Analog der Nomenklatur von Apoptose und Nekrose wurde diese Art des Zelltods als „NETose“ bezeichnet. Auch bei anderen Zellen des Immunsystems wie eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen wurde ein Zelluntergang bei Freisetzung von „Extracellular Traps“ beschrieben und entsprechend der Begriff „ETose“ eingeführt (77). NETose und ETose scheinen nicht nur bei der Keimbekämpfung involviert zu sein, sondern sind bei zahlreichen vaskuläre und entzündlichen Erkrankungen wie Schlaganfall (78), systemischem Lupus erythematoses (79) Peritonitis (80) und Sepsis (81) beteiligt. Somit sind NETs ein bis vor kurzem unbekannter, wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität.

Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) stellen eine grundlegende zelluläre Komponente des Immunsystems dar und sind für die Einleitung und Kontrolle der adaptiven Immunantwort verantwortlich. DCs exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Mustererkennungsrezeptoren mit denen sie sowohl PAMPs als DAMPs erkennen (82). Dies verleiht ihnen die Fähigkeit auf eindringende Krankheitserreger und endogene Zellschädigungen zu reagieren. Als potenteste Klasse der Antigen-präsentierenden Zellen sind DCs in der Lage Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und gegenüber T-Zellen zu präsentieren. Sie werden als Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität angesehen (83). Als Erstes wurden DCs in lymphatischen Geweben nachgewiesen (84, 85). Es hat sich jedoch gezeigt, dass DCs auch in nahezu allen anderen Geweben des Körpers vorhanden sind. Innerhalb der gesunden Niere sind reichlich DCs nachweisbar (60, 61), die als ortsständige renale dendritische Zellen (rDCs) in der Lage sind auf Reize sofort zu reagieren und durch die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie IL-6, MCP-1 und TNF α innerhalb der ersten 24 Stunden eine Initialzündung für die Rekrutierung weiterer Zellen zu geben (86).

1.3 Die Rolle des Immunsystems bei akuter Nierenschädigung

Bei der akuten Nierenschädigung läuft eine ausgeprägte Entzündungsreaktion ab, die durch Endothelschädigung, Tubulusnekrosen und glomeruläre Läsionen zu einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion führt. Geschädigte Endothelzellen exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und fördern dadurch die lokale Leukozytransmigration. Auch tubuläre Epithelzellen interagieren durch die verstärkte Expression von Toll-like Rezeptoren und die Ausschüttung zahlreicher inflammatorischer und chemotaktischer Zytokine wie TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 β und CCL-5 (RANTES) mit den Zellen des angeborenen Immunsystems (17, 87). TLR2 und TLR4 spielen dabei eine Schlüsselrolle. Beide werden sowohl auf renalen tubulären Epithelzellen (88, 89), als auch auf renalen Endothelzellen (90, 91) exprimiert und sind wahrscheinlich bei vielen, wenn nicht sogar allen Arten von Nierenerkrankungen beteiligt. Renale dendritische Zellen werden durch die tubuläre Schädigung aktiviert, die wiederum durch Antigenpräsentation und Expression co-stimulatorischer Moleküle naive T- Lymphozyten aktivieren und so angeborenes und erworbenes Immunsystem verbinden. Durch Ausschüttung von Chemokinen aus verschiedenen Zellen am Ort der Läsion werden weitere Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Lymphozyten in die Niere gelockt, was zur weiteren Verstärkung der Entzündungsreaktion beiträgt (87).

1.3.1 Immunantwort bei ischämischer akuter Nierenschädigung

Renale Ischämie-/Reperfusionsschäden sind eine der häufigsten Ursachen einer akuten Nierenschädigung. Sie lösen eine entzündliche Immunantwort aus durch welche die ursprüngliche Schädigung zusätzlich verstärkt wird (90, 92, 93). TLRs spielen eine zentrale Rolle bei der Ausprägung dieser ischämisch-bedingten sterilen Entzündung. *Tlr2*- und/oder *Tlr4*-defiziente Knockout-Mäuse sind nachweislich vor Ischämie-/Reperfusionsschäden der Leber (94), des Herzens (95) und der Niere (88, 96) geschützt. Chen et al. haben belegt, dass beim ischämischen Nierenschaden schon vier Stunden nach Reperfusion TLR4 auf den Endothelien des Nierenmarks exprimiert wird und verstärkt pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden (90). Dem TLR-vermittelten Entzündungsprozess geht eine erhöhte

Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen voraus, was den Durchtritt von Leukozyten in das Nierenparenchym begünstigt (97). Eine Inaktivierung der entsprechenden Adhäsionsmoleküle durch Antikörper verhindert nicht nur die Induktion der Entzündungsreaktion, sondern auch die Progression des ischämischen Nierenschadens (98).

1.3.2 Immunantwort bei septischer akuter Nierenschädigung

Eine Sepsis entwickelt sich dann, wenn die initiale und angemessene Abwehrreaktion des Körpers gegenüber einer Infektion dysreguliert wird. Die durch eine Sepsis induzierte Immunantwort beruht auf der Aktivierung von pro- und anti-entzündlichen Prozessen, die in einer ganz bestimmten Sequenz fast programmartig abläuft. Zunächst führt der mikrobielle Stimulus zur Aktivierung der angeborenen Immunität (99). Dadurch wird die Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere von Tumor Nekrose Faktor- α (100), Interleukin-1 und Interleukin-6 (101) induziert, was den Entzündungsprozess weiter verstärkt und zur hämodynamischen Instabilität, septischem Schock und Nierenfunktionsstörung beiträgt. Nach dieser pro-inflammatorischen Phase folgt eine kompensatorische anti-inflammatorische Immunantwort. Diese Phase der Immunsuppression zeichnet sich durch eine veränderte Zytokinproduktion, vermehrte Apoptose und verminderte Lymphozytenproliferation aus. Beide Phasen können sich teilweise überlappen (17).

Bei der Sepsis und der Endotoxin-induzierten akuten Nierenschädigung nimmt vor allem TLR4 eine Schlüsselrolle ein. Die Gruppe von Cunningham und Kollegen konnte im Maus-Modell zeigen, dass LPS mit TLR4 reagiert und durch Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α über nachfolgende intrarenale Prozesse wie der Apoptose von Nierenzellen und der renalen Infiltration von Neutrophilen zur akuten Nierenschädigung führt. Dahingegen sind C3H/HeJ Mäuse, welche eine natürliche Mutation von TLR4 aufweisen, vor einer LPS-induzierten akuten Nierenschädigung geschützt (26). Die Modulation der TLR4-vermittelten Signalwege stellt einen neuen therapeutischen Ansatz zur Therapie und Prophylaxe der Sepsis dar und steht im Fokus zahlreicher Studien, wobei klinische Erfolge bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnten (102).

1.4 Histone

1.4.1 Chemische Struktur

Histone sind nukleäre Proteine, die ausschließlich in eukaryotischen Zellen vorkommen und sich im Laufe der Evolution nur gering verändert haben. Entsprechend ihrer strukturellen Eigenschaften werden fünf Histonklassen unterschieden: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Alle Histone bestehen aus einer globulären Domäne und flexiblen N-terminalen Elongationen, die als „Histon Tails“ bezeichnet werden. Durch ihren hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin und Lysin sind Histone stark basisch und lagern sich so an die sauren Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats an (103).

1.4.2 Physiologische Funktion intrazellulärer Histone

Ursprünglich wurden Histone lediglich als Strukturproteine betrachtet, die zur Kompaktierung der DNA beitragen. 1974 beschrieb Roger Kornberg erstmals den strukturellen Aufbau des Nukleosoms und seine Bedeutung als kleinste Verpackungseinheit im Chromatin des eukaryotischen Genoms (104). Dieses besteht aus durchschnittlich 146 Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs, die sich mittels einer 1,75-fachen linksgängigen Windung um ein Histon-Oktamer wickeln, welches als „Core Particle“ bezeichnet wird. Das Oktamer bildet sich wiederum aus je zwei Kopien der „Core-Histone“: H2A, H2B, H3 und H4 (104, 105). Die „nackte“ DNA zwischen den Nukleosomen wird als „Linker DNA“ bezeichnet, welche beim Menschen einer Länge von etwa 50 Basenpaaren entspricht. Histon H1 bildet als „Linker Histon“ eine eigene Gruppe und lagert sich von außen an die DNA- Ein- und Austrittsstellen des Nukleosoms an, ohne andere Histone zu berühren (106).

DNA, Histon-Proteine und Nicht-Histon-Proteine, die ebenfalls DNA binden und kompaktieren, bilden zusammen das Chromatin. Die Organisation der Chromatinstruktur ist ein dynamischer Prozess, der durch Veränderung der Interaktionen zwischen Histonen und DNA die Genexpression beeinflusst, wodurch sich das Informationspotential der gleichen DNA-Sequenz vervielfacht. Diese strukturellen Veränderungen des Chromatins können an die nächste Generation vererbt werden und sind eine wesentliche Voraussetzung der

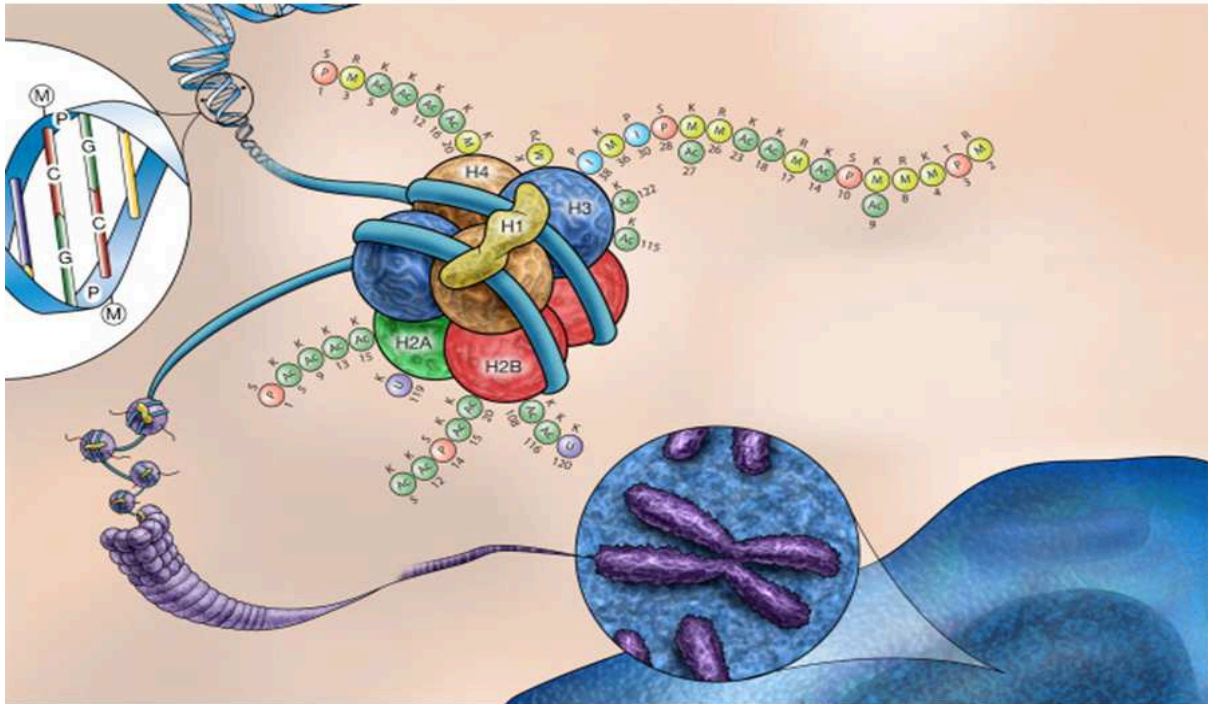


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Nukleosoms, modifiziert aus (111)

Der DNA-Doppelstrang windet sich um das Histon-Oktamer, bestehend aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Das Histone H1 lagert sich von außen an die DNA-Wicklung des Nukleosoms an.

Epigenetik (107), welche von Gerda Egger als „alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht bereits in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind“ (108) definiert wurde. Epigenetische „Histon-Markierungen“ entstehen durch kovalente Proteinmodifikationen, die die elektrostatische Ladung und dadurch auch die Struktur und DNA-Affinität der Histone verändern (109). An freigelegte DNA-Bereiche können Transkriptionsfaktoren binden. Zum anderen können diese Modifikationen spezifische Bindungsstellen für andere Proteine schaffen, wodurch funktionelle Proteinkomplexe rekrutiert werden können (110). Die N-Termini der Core-Histone sind flexible Regionen, die aus den Nukleosomen herausragen und dadurch besonders zugänglich für posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung (109). Die vielfältigen Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikationen der Core-Histone und die damit verbundenen Regulationsprozesse im Zellkern haben zur Postulierung der Histon-Code-Hypothese geführt (110). Danach vermitteln spezifische Kombinationen von Histon-Modifikationen einen Code, der von anderen Proteinen erkannt wird und so das Informationspotential der DNA-Sequenz erweitert (103).

1.4.3 Spezielle Rolle der extrazellulären Histone

Die Tatsache, dass extrazelluläre Histone die Fähigkeit besitzen Zellen abzutöten ist schon lange bekannt. Bereits 1958 haben Hirsch und Kollegen den bakteriziden Effekt von Histonen auf *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und andere Erreger nachgewiesen (112). Auch die erstmals im Jahre 2004 beschriebene Beobachtung der NETose weisen in diese Richtung. Wie bereits unter 1.2.4 erläutert konnte die Arbeitsgruppe von Arturo Zychlinsky zeigen, dass beim Zelluntergang von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunabwehr Histone und andere endogene Moleküle in den Extrazellularraum freigesetzt werden und als NETs Bakterien binden und abtöten (72).

Dass durch extrazelluläre Histone neben Bakterien auch körpereigenes Gewebe geschädigt werden kann, wurde erstmals in einer Arbeit von Xu und Kollegen 2011 beschrieben. Diese belegten die zytotoxische Effekte von Histonen auf Endothelzellen der Lunge in vitro und die letale Wirkung extrazellulärer Histone in vivo. Mäuse denen eine subletale Dosis von Histonen verabreicht wurde, zeigten charakteristische pulmonale Veränderungen wie bei Sepsis. Durch Antikörper gegen Histon-H4 konnte im Mausmodell die LPS-induzierte Letalität gesenkt werden. Die Autoren schlossen daraus, dass Histone als Mediatoren wesentlich an Entzündungsprozessen beteiligt sind (113).

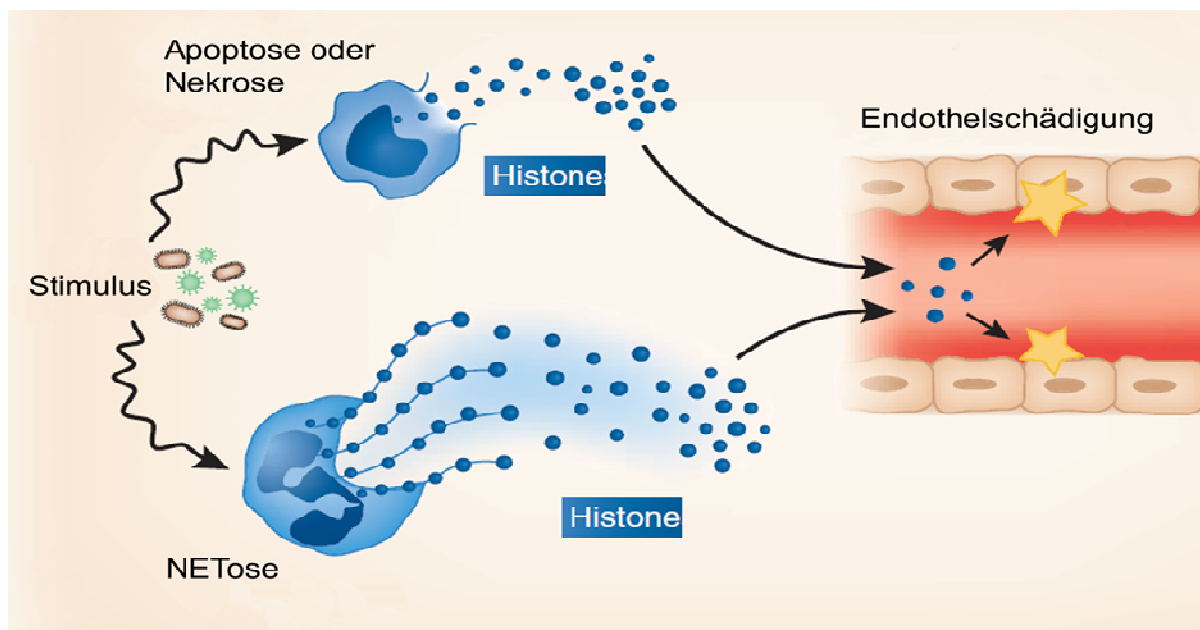


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Freisetzung von Histonen in den Extrazellularraum

Histone werden durch NETose, Apoptose oder Nekrose in den Extrazellularraum freigesetzt. und wirken als extrazelluläre Histone zytotoxisch. Abbildung modifiziert aus (114).

1.4.4 In-vitro Studien zur Interaktion von Histonen und TLR 2/4

In Vorarbeiten zu der hier zu bearbeitenden Fragestellung wurden im Labor von Herrn Prof. Anders Experimente zur Wirkung von Histonen in vitro durchgeführt. Aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen wurden dendritische Zellen gewonnen und diese für 6 Stunden mit (A) einem Gemisch von Histonen (30µg/ml), sowie mit (B) unterschiedlichen Histon-Klassen (30µg/ml) und LPS (1µg/ml) stimuliert und im Anschluss die TNFα-Produktion mittels ELISA ermittelt. Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit (C) *Tlr2/4* Knockout Mäusen durchgeführt. Es konnte belegt werden, dass Histone, vor allem die Klassen H2B und H4 zu einer gesteigerten Freisetzung von Zytokinen, insbesondere von TNFα führen. Dieser Effekt bleibt bei Mäusen ohne TLR2/4 Rezeptoren vollständig aus. Des Weiteren konnte mittels NT-647 Fluoreszenz-markiertem Histon H4 durch Thermophorese die direkte Bindung von Histonen an TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden (115).

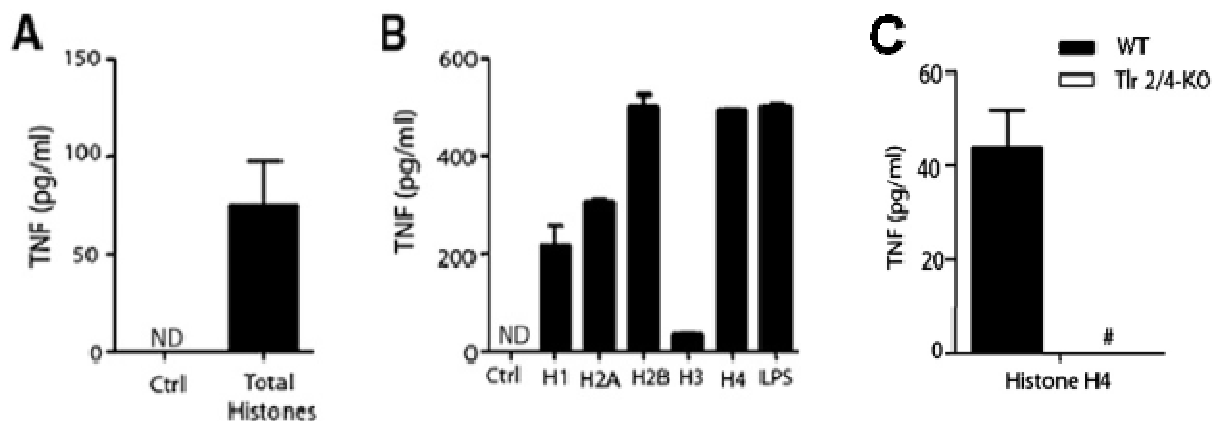


Abbildung 8: Extrazelluläre Histone aktivieren die Produktion von TNFα, modifiziert aus (115)

TNFα - ELISA vom Überstand dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen, welcher für 6 Stunden mit Histonen (30 mg/ml) stimuliert worden waren. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten ± SEM dar.

- A. TNFα-Konzentration im Überstand dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen nach in-vitro Stimulation mit einem Gemisch aller Histon-Klassen („Total Histones“).
- B. TNFα-Konzentration im Überstand dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen nach in-vitro Stimulation mit unterschiedlichen Histon-Klassen (H1, H2A, H2B, H3, H4) und LPS.
- C. TNFα-Konzentration im Überstand dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen und TLR 2/4 doppelt defizienten Knockout-Mäusen nach in-vitro Stimulation mit Histon H4.

1.5 Fragestellung und Hypothese

Xu und Kollegen haben erstmals postuliert, dass extrazelluläre Histone als Mediatoren der Sepsis wesentlich an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Sie belegten die toxische Wirkung extrazellulärer Histone auf pulmonale Endothelzellen *in-vitro* und wiesen nach, dass anti-Histon Immunglobulin G (IgG) die LPS-induzierte Letalität im Mausmodell signifikant senkt (113).

In meiner Dissertationsarbeit sollten nun die Effekte extrazellulärer Histone auf renale Zellen *in-vitro* und die entzündliche Wirkung extrazellulärer Histone speziell auf die Niere *in-vivo* überprüft werden. In Analogie zu den o.g. Untersuchungen von Xu und Kollegen sollte nun untersucht werden, ob auch durch eine Organschädigung der Niere Histone in den Extrazellularraum freigesetzt werden und ob diese als „Danger Signale“ einen sterilen Entzündungsprozess mit den dafür charakteristischen Merkmalen auslösen. In Ergänzung zu den Vorversuchen aus unserem eigenen Labor sollte ferner geprüft werden, ob ein solcher Entzündungsprozess über Mustererkennungs-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, speziell TLR2 und TLR4 abläuft. Bisherige Untersuchungen wiesen darauf hin, dass eine akute Nierenschädigung bei der Maus sowohl im Sepsismodell mit LPS als auch mit der Induktion eines Ischämie-/Reperfusionsschadens erzeugt werden kann. Es galt zu prüfen, ob extrazelluläre Histone am Ausmaß der akuten Nierenschädigung beteiligt sind und im Umkehrschluss die Gabe von anti-Histon IgG nephroprotektiv wirkt.

In meiner Dissertationsarbeit sollten daher die folgenden Hypothesen überprüft werden: Histone sind Mediatoren der akuten Nierenschädigung. Durch eine septisch- oder ischämisch-bedingte akute Nierenschädigung werden u.a. Histone in den Extrazellularraum freigesetzt, die als Gefahrensignale wirksam werden und über Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems, speziell TLR2 und TLR4, die sterile Entzündung verstärken und Effektormechanismen auslösen, welche die Nierenschädigung aggravieren.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Zellkultivierung und -zählung

CD Hybridoma-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cryobox Cryo 1°C freezing container	Nalgene™, Rochester, NY, USA
Cryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
DMEM w/glucose	Gibco/Life Technologies, Grand Island, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA (Versen)	Biochrom KG, Berlin, D
Eppendorfgefäße 1,5ml	TPP, Trasadingen, CH
Falcon 15ml	TPP, Trasadingen, CH
Fetales Bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, D
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Pipetten Pipetman®	Gilson, Middleton, WI, USA
RPMI-1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Steril Card Hood CII, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin/ EDTA	PAN Biotech KG, Berlin, A
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Solms, D
6-well- Zellkulturschale	Costar Corning, Schiphol-Rijk, N
96-well-Zellkulturschale	TPP, Trasadingen, CH
Zählkammer-Neubauer	Roth, Karlsruhe, D
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 150 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg, D
Zellinkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode, D

Zellisolation

ÄKTApurifier	GE Healthcare, München, D
CD11c Microbeads	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, D
EGF	Roche Diagnostics, Mannheim, D
GHP Column (Trennsäule)	GE Healthcare, München, D
HBSS	Sigma Aldrich, Steinheim, D
HEPES	Gibco/Life Technologies, Grand Island, USA
Hydrocortison	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Insulin-Transferrin- Supplement	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Kollagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim, D
LS Column (Trennsäule)	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, D
MACS®-Filter	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
PGE-1	Roche Diagnostics, Mannheim, D
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, D
Seperation-Tubes Miltenyi	Biotec, Berg.-Gladbach, D
Trijodthyronin	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Zellsieb (Porengröße 70 µm)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Stimulationsexperimente in-vitro

CellTiter 96® Proliferation Assay	Promega, Mannheim, D
CpG	Invivogen, Toulouse, F
Pam3CSK4 (P ₃ C)	Invivogen, Toulouse, F
Total Histones from calf thymus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Ultra Pure E.coli LPS	Invivogen, Toulouse, F

Zentrifugen

Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, D

2.1.2 Zelllinien

Glomeruläre Endothelzellen der Maus

Die in den in-vitro Stimulationsversuchen dieser Promotionsarbeit verwendeten murinen glomerulären Endothelzellen (GenC) wurden freundlicherweise von Nese Akis (Institut für Molekularbiologie und Genetik der Halic Universität, Istanbul, Türkei) bereitgestellt. Die Isolation und Charakterisierung dieser Zellen wurde ausführlich von Nese Akis et al. beschrieben (116). Hierbei wurden Glomeruli von tsA58 Immorto-Mäusen verwendet um primäre Zellen zu gewinnen, deren Klone unter Verwendung des Temperatursensitiven tsA58 Gens immortalisiert wurden. Mit Hilfe von Ratten-anti-Maus-CD31Antikörpern und magnetischen Beads wurden gezielt Zellen selektioniert, die das endotheliale Oberflächenmolekül CD31 (PECAM-1) aufwiesen. Die weitere Isolierung der Endothelzellklone erfolgte anhand ihrer Fähigkeit azetyliertes LDL aufzunehmen. Die Untersuchung der so gewonnenen Zellen ergab eine positive Testung für weitere endothelspezifische Marker wie CD54 (ICAM-1), CD62E (E-Selectin) und CD106 (VCAM-1), sowie eine negative Testung für Marker epithelialer und mesangialer Zellen.

BWA3-Hybridomazellen zur Gewinnung von anti-Histon IgG

Die BWA3-Hybridomazellen zur Gewinnung von anti-Histon IgG wurden freundlicherweise von Dr. Marc Monestier (Institut für Mikrobiologie und Immunologie, Temple Universität, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden entsprechende anti-Histon IgG produzierende Plasmazellen aus der Milz autoimmuner Mäuse des Stammes NZBxNZW/F1 isoliert und mit nicht sezernierenden Zellen des Plasmazytoms SP2/0 fusioniert. Als nächstes erfolgte ein Screening-Verfahren zur Überprüfung der spezifischen Antikörperproduktion. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand der Hybridomazellen mit Histonen (total bovine thymus histones) inkubiert, Zellen mittels Antigen-Antikörper Reaktionen farblich markiert und der Histon-reaktive murine monoklonale Antikörper BWA3 (IgG1k) isoliert. Marc Monestier und Kollegen wiesen durch Affinitätschromatographie nach, dass BWA3 am stärksten mit Histon H4, sowie stark mit Histon H2A reagiert (117). Zum besseren Verständnis wird BWA3 in dieser Arbeit als „anti-Histon IgG“ bezeichnet.

2.1.3 ELISA

ELISA Microplate Strip Washer ELx50	Biotech, Bad Friedrichshall, D
ELISA-Reader, Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
Mouse IL-6 ELISA Set BD OptEIA™	BD Bioscience, Heidelberg, D
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Tween-20	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

2.1.4 Tierversuche

Versuchstiere

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
TLR 2/4 -/- Mäuse	Liliana Schäfer, Institut für Allgemeine Pharmakologie u. Toxikologie, Frankfurt, D

Narkose und Organentnahme

Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, D
Einbettkassetten	NeoLab, Heidelberg, D

Serum-Kreatininbestimmung

Kreatinin FS Set	DiaSys, Holzheim, Deutschland
------------------	-------------------------------

Stimulationsexperimente in-vivo

APC (Xigris®)	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
E.coli LPS	Invivogen, Toulouse, F
Falcon 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Felxüle, 20-Gauge	Braun, Melsungen, D
FITC-markiertes Dextran	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel	Thermo Electron Cooperation, Waltham, USA
Mikrokanüle, 31-Gauge	FST, Heidelberg, D
Mouse IgG (Kontroll-IgG)	Abcam PLC, Cambridge, UK
Nadeln Microlance 26 Gx ½ BD	Biosciences, Heidelberg, D

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
OPMI 1-FC Operationsmikroskop	Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Proteinkinase K	Merck, Darmstadt, D
Ratten-anti-Maus CD45-Antikörper	Serotec, Oxford, UK
Sarstedt Kanüle 21-G	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sensicam, CCD-Kamera	PCO, Kelheim, D
Spritzen BD Plastipak 1,2,5 ml BD	Biosciences, Heidelberg, D
Total Histones from calf thymus	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

2.1.5 Molekularbiologische Analysen

RNA-Isolation

Eppendorfgefäße 1,5 ml	TPP, Trasadingen, CH
Homogenisator	Ultra Turrax T25, Staufen, D
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen 1-1 000 µl Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen, D
PureLink® RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt, D
RNase-free-Spray	Gene Choice, Frederick, USA
RNase-freies DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden D

cDNA-Synthese

linear Acrylamid (15 µg/ml)	Ambion, Darmstadt, D
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe, D
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, D
dNTPs (25mM)	GE Healthcare, München, D
RNAsin (40 U/µl)	Promega, Mannheim, D
Superscript II, Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D

RT-PCR

BSA PCR grade (20 mg/ml)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
BioStab PCR Optimizer (5x)	Biotop, Witten, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
LightCycler® 480 Real-Time PCR	System Roche, Mannheim, D
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTPs (25 mM)	GE Healthcare, München, D
10xTaq-Puffer ohne Detergenzien	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RT-PCR SYBR Green Primers	Metabion, Martinsried, D
SYBR Green I	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Taq DNA- Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Vorwärts-/ Rückwärts-Primer	Metabion, Martinsried, D

Primersequenzen für die RT-PCR

CXCL2	Vorwärts-Primer	5'- CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG-3'
	Rückwärts-Primer	5'- TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'
CXCL10	Vorwärts-Primer	5'- ATGGATGGACAGCAGAGAGC -3'
	Rückwärts-Primer	5'- GGCTGGTCACCTTTCAGAAG -3'
CCL-5 (RANTES)	Vorwärts-Primer	5'- GTGCCCACGTCAAGGAGTAT -3'
	Rückwärts-Primer	5'- CCACTTCTTCTCTGGGTG -3'
ICAM-1	Vorwärts-Primer	5'- AACAGTTCACCTGCACGGAC -3'
	Rückwärts-Primer	5'- GTCACCGTTGTGATCCCTG -3'
IL-6	Vorwärts-Primer	5'- TGATGCACTTGCAGAAAACA -3'
	Rückwärts-Primer	5'- ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC - 3'
IL-12	Vorwärts-Primer	5'- CTAGACAAGGGCATGCTGGT - 3'
	Rückwärts-Primer	5'- GCTTCTCCCACAGGAGGTTT - 3'
KIM-1	Vorwärts-Primer	5'- TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT -3'
	Rückwärts-Primer	5'- TCAGCTCGGGAATGCACAA -3'
Nos2 (iNos1)	Vorwärts-Primer	5'- TGAAGAAAACCCCTTGTGCT -3'
	Rückwärts-Primer	5'- TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG -3'

TNF- α	Vorwärts-Primer	5'- CCACCACGCTCTTCTGTCTAC -3'
	Rückwärts-Primer	5'- AGGGTCTGGGCCATAGAAGT - 3'
18s RNA	Vorwärts-Primer	5'- GCAATTATTCCCCATGAACG-3'
	Rückwärts-Primer	5'- AGGGCCTCACTAAACCATCC- 3'

2.1.6 Histologie

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, D
Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
biotinilierter Sekundär-AK	Vector, Burlingame, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt, D
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
JEOL 1200 EX Elektronenmikroskop	JEOL, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen, D
Mounting Medium, VectaMount	Vector, Burlingame, USA
Perjodsäure	Bio-Optica, Mailand, I
Ratte anti-Maus Neutrophilen-Antikörper	Serotec, Oxford, UK
Ratten-anti-Maus Ly6G-Antikörper	Serotec, Oxford, UK
Ratten-anti-Maus F4/80- Antikörper	Serotec, Oxford, UK
Schiffsche-Lösung	Bio-Optica, Mailand, I
Xylol	Merck, Darmstadt, D

2.1.7 Software

Endnote x4	Thomson-Reuters, New York, NY, USA
Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen, Zählung und Einfrieren von Zellen

Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung muriner glomerulärer Endothelzelllinien (GEnC) und primärer tubulärer Epithelzellen (TEC) erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C mit 5% CO₂ – Begasung. Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Unter der Sterilbank sorgten ein Filter und ein laminarer Luftstrom für eine keimfreie Umgebung. Sowohl der Arbeitsplatz, als auch alle Geräte und Materialien wurden vor Gebrauch mit Desinfektionsmittel (70%-igem Ethanol) gereinigt.

Kultivierung und Passage muriner glomerulärer Endothelzellen (GEnC)

Die murinen glomerulären Endothelzellen wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10% FCS und 1% PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und in der Regel alle drei bis vier Tage passagiert. Zur Passagierung wurden 100%ig konfluente Zellen zunächst zweimalig mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 2 ml 1,5 mM Trypsin/EDTA für 7 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch diesen Vorgang wurden die Zellverbände vom Flaschenboden gelöst, was sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch überprüft wurde. Die Zugabe von 3 ml RPMI 1640-Medium mit 10% FCS beendete den lysierenden Effekt von Trypsin/EDTA, wodurch die Schädigung der bereits abgelösten Zellen verhindert wurde. Anschließend wurde die entstandene Suspension in ein 10 ml -Falcon pipettiert und bei 1000 Umdrehungen/ Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 in einer 75 cm² Zellkulturflaschen passagiert oder für experimentelle Ansätze auf 96-well-Platten pipettiert.

Kultivierung von BWA3-Hybridomazellen zur Produktion von anti-Histon IgG

Die BWA3-Hybridomazellen wurden zunächst mit Wachstumsmedium bestehend aus DMEM-Glutamax, 10% FCS und 1% PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in 150cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, wobei das Medium alle 3 Tage gewechselt wurde. Nach

ausreichender Vermehrung der Zellen wurde zur besseren Antikörperproduktion ein spezielles Hybridoma-Medium verwendet, was sich aus CD Hybridoma Medium, 5% FCS, 1% PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) und 2 mM Glutamin zusammensetzt. Nach 7 Tagen konnten die gewünschten Antikörper geerntet werden.

Gewinnung von anti-Histon IgG

Hierfür wurde der Überstand von BWA3-Hybridomazellen 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. 270 ml des von Zellbestandteilen befreiten Überstandes wurden im nächsten Schritt mit 30 ml 10x Bindepuffer gemischt. Die Reinigung erfolgte mittels 1 ml High Trap Protein GHP-Säule und dem ÄKTApurifier-System. Der äquilibrierte Überstand wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über einer Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Bindepuffer gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem Glycinpuffer (100 mM Glycin, pH 2,7) in 1 ml Fraktionen eluiert. Zur Neutralisierung wurden 0,2 ml Tris-Puffer (1 M, pH 9) zur Elutionsfraktion zugegeben. Zur Reinigung der Antikörper wurden 100 ml Mediumüberstand mit 4x Bindepuffer (20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) äquilibriert und anschließend durch 0,45 µm große Poren gefiltert. Die Konzentration der gereinigten anti-Histon IgGs (mg/ml) wurde bestimmt, indem mittels eines Spektralphotometer bei 280 nm die Gesamt-Proteinkonzentration gemessen und mit dem Faktor 0,7 multipliziert wurde.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden vor der Konservierung in flüssigem Stickstoff unter dem Mikroskop auf ein gesundes Aussehen und eine Konfluenz von 80-90% überprüft. Zunächst wurden die Zellen wie beim regulären Passagieren nach dem Waschen mit PBS mittels 1,5 mM EDTA/Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das übrig gebliebene Zellpellet mit dem frisch hergestellten Einfriermedium bestehend aus FCS mit 10% DMSO resuspendiert. In jedes einzufrierende Kryoröhrchen wurde etwa 1,5 ml mit 5-10 Millionen Zellen pipettiert und diese in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Nach frühestens 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen vom Gefrierschrank bei -80°C in flüssigem Stickstoff umdeponiert und so langfristig konserviert.

Wenn in flüssigem Stickstoff konservierte Zellen wieder verwendet werden sollten, wurden diese im Wasserbad vorsichtig aufgetaut. Die enthaltene Zellsuspension wurde direkt in eine 75 cm² Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und 1% PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) überführt und kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um den toxischen Effekt des DMSO auf die Zellen zu minimieren.

Quantifizierung vitaler Zellen

Zur Zellzählung wurden die Zellen wie zuvor beschrieben vom Schalenboden gelöst und zentrifugiert. Im Anschluss wurde das entstandene Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und jeweils 50 µl hiervon mit 50 µl Trypanblau vermischt. Durch die gesteigerte Durchlässigkeit geschädigter Membranen wurden insbesondere tote Zellen angefärbt, während lebende Zellen hell blieben, was eine Differenzierung der Zellvitalität ermöglichte. Die eigentliche Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus zwei Außenstegen und einem Kammerboden mit eingraviertem Zählnetz. Die Außenstege wurden mit destilliertem Wasser befeuchtet und das Deckglas mit sanftem Druck auf die Zählkammer geschoben. Durch die tiefere Lage des Kammerbodens entstand beim Auflegen der Deckplatte ein Spalt in den die Zellsuspension hinein pipettiert wurde. Bei Bildung von Luftblasen oder Überfüllung musste der Vorgang wiederholt werden. Es wurden die lebenden Zellen aller vier Großquadrate gezählt. Zur Vermeidung von Mehrfachzählungen von Zellen an Grenzlinien, erfolgte die Zellzählung immer nach dem gleichen Schema. Eingeschlossen wurden jeweils nur Zellen, welche sich an der linken und oberen Linie befanden. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Isolierung von murinen primären Zellpopulationen der Niere

Isolierung muriner primärer tubulärer Epithelzellen

Die Isolierung muriner primärer tubulärer Epithelzellen (TECs) erfolgte entsprechend der Methode von Terryn et al. (118) nach einer Modifikation aus unserem eigenen Labor (119). Die sechs Wochen alten Wildtyp C57BL/6-Mäuse wurden nach Narkose auf den Rücken gelegt und an den Extremitäten fixiert. Nach durchgehender longitudinaler Inzision des Abdomen bis zum Sternum und parasternaler Eröffnung des Thorax wurden die Nieren und das Herz freigelegt. Dann wurde die Vena cava inferior mit einer scharfen Schere eingeschnitten, der linke Ventrikel mit einer 21-G Punktionskanüle punktiert und der große Kreislauf mit etwa 40 ml PBS perfundiert bis sich die Nieren optisch blutleer darstellten. Nach Nierenentnahme wurde die Kapsel entfernt und das Nierengewebe mit einem Skalpell in etwa 1 mm große Stückchen geschnitten. Das Gewebe wurde dann über 30 Minuten bei 37 °C in Kollagenase A inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das zerkleinerte Nierengewebe wurde durch ein mit 1x PBS befeuchtetes Sieb mit einer Porengröße von 70 µm in ein 50 ml Falcon Röhrchen gepresst, bei 1500 Umdrehungen/ Minute für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Bodensatz mit 2 ml 1x PBS suspendiert. Die Separation der tubulären Bestandteile erfolgte mit 31% Percoll und Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen/ Minute über 10 Minuten. Danach erfolgten zwei Waschschrte bei denen jeweils nach Entfernung des Überstands das Pellet mit 3ml 1x PBS resuspendiert und im Anschluss bei 12000 Umdrehungen/Minute für 5 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Schließlich wurde das in Medium suspendierte Pellet zur Kultivierung in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert. Als Medium für die Kultivierung von TEC diente DMEM w/Glucose mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 1% Penicillin/ Streptomycin, HBSS, HEPES und EGF, Trijodthyronin, Hydrocortison, PGE-1 und Insulin-Transferrin-Natriumselenit-Supplement. Nach etwa fünf Tagen war der Zellboden konfluent. Die Zellen wurden nach zweimaliger PBS-Waschung mit 2 ml 1,5 mM Trypsin/EDTA für 7 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert und so vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden 3 ml DMEM zugefügt und die Suspension in ein 10ml-Falkon pipettiert und bei 1000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert, gezählt und für experimentelle Ansätze auf 96-Well-Platten ausplattiert.

Isolierung primärer renaler dendritischer Zellen der Maus

Die Isolierung primärer renaler dendritischer Zellen (rDCs) der Maus erfolgte entsprechend Labor-interner Modifikationen der Methode von Katharina Hochheiser et al. (120). 7-Wochen alte männliche C57/BL6 Wildtyp-Mäuse bzw. *Tlr2/4* Doppel-Knockout – Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und beide Nieren mittels einer medianen Laparotomie entnommen. Nach Entfernung der Kapsel wurden die Nieren für 30 Minuten bei 37°C in einem Verdauungs-Puffer (RPMI 1640 Medium + 1 mg/ml Kollagenase D + 100 µg/ml DNase-I + 20 mM HEPES) inkubiert, zerkleinert und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Gemisch aus Nierenstückchen und Verdauungspuffer wurde durch Einsaugen und Ausdrücken durch eine 1 ml-Spritze mit einer 26 ½ G Nadel weiter zerkleinert. Die so entstandene Zellsuspension wurde mittels eines 30-µm MACS®-Filters aufgereinigt und bei 1200 Umdrehungen/ Minute für 1 Minute bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 600 µl MACS-Puffer (PBS + 0,5% FBS + 2 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl Nanobead-markierten CD11c-spezifischen monoklonalen Antikörpern (CD11c-Microbeads) wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung wurden 10 ml MACS-Puffer zugefügt, das Gemisch bei 1500 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellseparation erfolgte unter Verwendung des QuadroMACS™ Separators nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Hierfür wurden die magnetischen Trennsäulen (LS-Columns) an den entsprechenden Magneten gehängt und mit 5 ml MACS-Puffer befeuchtet. Schließlich wurde 1 ml der in MACS-Puffer suspendierten Zellen auf die Säulen aufgetragen und die Säulen im Anschluss dreimal mit MACS-Puffer gewaschen. Letztlich wurden die CD11c+ Zellen aufgrund der magnetisch markierten Antikörper in den Trennsäulen gehalten, während unmarkierte Zellen abgetrennt wurden. Nach Entfernung der Trennsäulen aus dem Magnetfeld wurden die magnetisch separierten dendritischen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer aus den Säulen gespült und bei 1200 Umdrehungen/ Minute für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in Kulturmedium (RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) auf 6-Well-Platten ausgesät.

2.2.3 Stimulation renaler Zellen mit extrazellulären Histonen

Proliferationsexperimente tubulärer Epithel- und glomerulärer Endothelzellen

Für die Versuche wurden 10.000 tubuläre Epithelzellen oder glomeruläre Endothelzellen in 100 µl RPMI-Medium mit 2 % FCS pro Well in 96-well-Plate Platten für 24 Stunden kultiviert und im Anschluss mit aufsteigenden Histon-Konzentrationen (5 µg/ml bis 300 µg/ml) oder TLR-Agonisten (3 µg/ml LPS, 6 µg/ml CpG, 3 µg/ml Pam3CSK) stimuliert. Die Wirkung der einzelnen Stimuli auf Zellvitalität und -proliferation wurde mit Hilfe des CellTiter 96®AQueousOne Solution Cell Proliferation Assays entsprechend des Herstellerprotokolls ermittelt. Nach der Ligandenstimulation wurden 20 µl „One Solution Reagent“ pro Well hinzugegeben. Die Lösung bestand aus dem Tetrazoliumsalz MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium] und Phenazinmethosulfat (PMS). Durch Dehydrogenase Enzyme metabolisch aktiver, lebender Zellen wurden die Reduktionsäquivalente NADPH und NADH freigesetzt, die MTS in Anwesenheit von PMS zu Formazan reduzierten und so einen Farbumschlag von gelb zu violett verursachten. Die Quantität des Formazans wurde mittels eines Spektrophotometer bei einer Absorption von 492nm nach zwei Stunden gemessen und ist direkt proportional zur Zahl lebender Zellen.

Stimulation primärer renaler dendritischer Zellen mit Histonen

200.000 primäre renale dendritische Zellen von C57/BL6 Wildtyp-Mäusen oder *Tlr 2/4* doppel-defizienten Knockout-Mäusen wurden auf jeweils einem Well einer 12-Well-Platte ausgesät und mit RPMI-Medium, 1 µg/ml LPS oder unterschiedlichen Histon-Konzentrationen (10, 50, 100 µg/ml Histone) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Überstand jedes Wells separat entnommen und in jeweils ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Die so gewonnenen Proben wurden mittels IL-6 ELISA analysiert.

2.2.4 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-6 im Überstand renaler dendritischer Zellen erfolgte mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nach dem Herstellerprotokoll der entsprechenden ELISA Sets von BD OptEIA™. Als Erstes erfolgte das

sog. „Coating“ der 96-Well-Mikrotiterplatte, indem jeweils 100 µl/Well des in einem Verhältnis von 1:250 in Beschichtungspuffers gelösten ersten Antikörpers (engl. coating antibody) aufgetragen wurden. Die Platte wurde daraufhin verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl/Well Waschlösung wurden die Platten mit 200 µl/Well Probenverdünner (engl. assay diluent) geblockt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen wurden jeweils 100 µl der Proben bzw. der Standardreihe aufgetragen. Aus einem Standard-Grundstock war zuvor eine Verdünnungsreihe (300 pg/ml bis 4,7 pg/ml) angefertigt worden so dass jeweils Standards mit unterschiedlichen bekannten Konzentrationen des gesuchten Antigens vorlagen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten weitere fünfmal gewaschen und im Anschluss jeweils 100 µl/Well Detektor Reagenz bestehend aus dem zweiten Antikörper (engl. detection antibody) und dem Enzymreagenz hinzugefügt. Die Platten wurden für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und siebenmal gewaschen. Es erfolgte die Induktion der Enzymreaktion durch die Auftragung von 100 µl/Well Substratlösung und 30-minütiger Inkubation im Dunkeln. Die hierbei ablaufende Farbreaktion wurde schließlich mittels 50 µl/Well Stopplösung beendet und mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts die Absorption von 450 nm bestimmt.

Tabelle 3: Materialien für Interleukin-6 ELISA

Waschlösung	PBS + 0,05% Tween-20
Beschichtungspuffer	0,1 M Natrium-Carbonat*
Probenverdünner	PBS mit 10% FCS, pH 7,0
1. Antikörper	Anti-Maus IL-6 monoklonaler Antikörper
Detektor-Reagenz: 2. Antikörper + Enzym	Biotinierter Anti-Maus IL-6 monoklonaler Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase markiertem Streptavidin (Verhältnis 1:250)
Standard	Rekombinantes Maus IL-6

* 0,1 M Natrium-Carbonat: 7,13 g NaHCO₃, 1,6 g Na₂CO₃ gelöst in 1l H₂O, pH 9

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

Blutentnahme und Bestimmung der Serum-Kreatininkonzentration

Vor der Blutentnahme wurden die Mäuse in einer Anästhesie-Kammer mit Isofluran narkotisiert. Etwa 0,5-1 ml Vollblut wurde mittels einer Glaskapillare aus dem Venenplexus des medialen Augenwinkels gewonnen und in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß mit 20 µl 0,5-molarem EDTA antikoaguliert. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben 5 Minuten bei 10.000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Berechnung der Kreatininkonzentration im Serum erfolgte mittels der Jaffé-Methode. Hierbei handelt es sich um einen kinetischen Farbttest, der auf der chemischen Eigenschaft des Kreatinins beruht, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orange-roten Farbkomplex zu bilden. Die mit dem Photometer gemessene Extinktionsdifferenz zu festgelegten Zeiten ist proportional zur Kreatininkonzentration. Die in dieser Dissertationsarbeit gezeigten Serum-Kreatinin Werte wurden mit dem Creatinin-FS Set der Firma DiaSys bestimmt. Jedes Set enthielt jeweils eine Flasche der angegebenen Lösung: Reagenz 1 (Natriumhydroxid 0,2 mol/l), Reagenz 2 (Pikrinsäure 177 µmol/l) und Standard (2 mg/dl). Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden kurz vor der Messung vier Teile des Reagenz 1 mit einem Teil des Reagenz 2 vermischt, wodurch das Gebrauchsreagenz entstand. Jeweils 10 µl von Serumproben, Standards oder destilliertem Wasser (Leerwert) wurden in ein Well einer 96-Well ELISA-Platte pipettiert und im Anschluss mit 200 µl des Gebrauchsreagenz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Sekunden erfolgte mittels ELISA-Reader bei 490 nm die erste photometrische Messung der Extinktion (E1). Nach weiteren 120 Sekunden wurde die zweite Extinktion (E2) abgelesen. Aus dem Mittelwert beider Extinktionen wurde durch Subtraktion des Leerwerts vom Wert der Proben bzw. des Standards die Extinktionsdifferenz berechnet. Anhand dieser Werte konnte entsprechend folgender Formel die Serum-Kreatininkonzentration abgeleitet werden: $\text{Kreatinin [mg/dl]} = \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \times \text{Konzentration Standard [mg/dl]}$.

Unilaterale arterielle Perfusion der Niere

Die selektive Nierenarterienperfusion wurde gemeinsam mit Professor Dr. med. Bernd Hohenstein am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden durchgeführt. Männliche 10 Wochen alte C57/BL6 Wildtyp-Mäuse wurden in einer Anästhesiebox mit Isofluran anästhesiert und nach Eintritt der Narkose auf dem OP-Tisch platziert. Durch das Anlegen einer Narkosemaske wurde auch während der Operation eine kontinuierliche Anästhesie durch Isofluran gewährleistet. Nach Eröffnung der linken Flanke durch einen ca. 2,5 cm langen Längsschnitt parallel zu Wirbelsäule, wurde die diesseitige Niere mobilisiert. Es erfolgte die sorgfältiger Freilegung und Präparation der linken Nierenarterie und der abdominalen Aorta, woraufhin eine 31-Gauge Mikrokanüle über die Aorta in die Arteria renalis eingeführt wurde. Die Mikro-Kanüle war über einen Luer-Lock-Anschluss an eine kurze Perfusorleitung adaptiert, welche an eine 20-Gauge Felxüle angeschlossen wurde (Abbildung 9). Die Testsubstanzen wurden mit einem Gesamtvolumen von 150 bis 200 µl in die linke Nierenarterie injiziert. Nach erfolgreicher Perfusion wurde die Aorta kranial der Einstichstelle abgeklemmt und so die Durchblutung der Niere kurzzeitig unterbrochen. Im Anschluss schloss man die Wunde mit flüssigem Sofortkleber, der mit Hilfe einer 10 µl Pipette aufgetragen wurde. Nach 2 Minuten war der Kleber getrocknet und die Klammern konnten entfernt werden, so dass die Niere wieder normal durchblutet wurde. Die Ischämiezeit betrug maximal 5 Minuten. Die gesamte Operation fand unter Verwendung eines Zeiss OPMI 1-FC Operationsmikroskops statt. Im Anschluss wurde die Niere wieder in den Körper zurückgeschoben und die Wunde mittels Schichtnähten verschlossen.

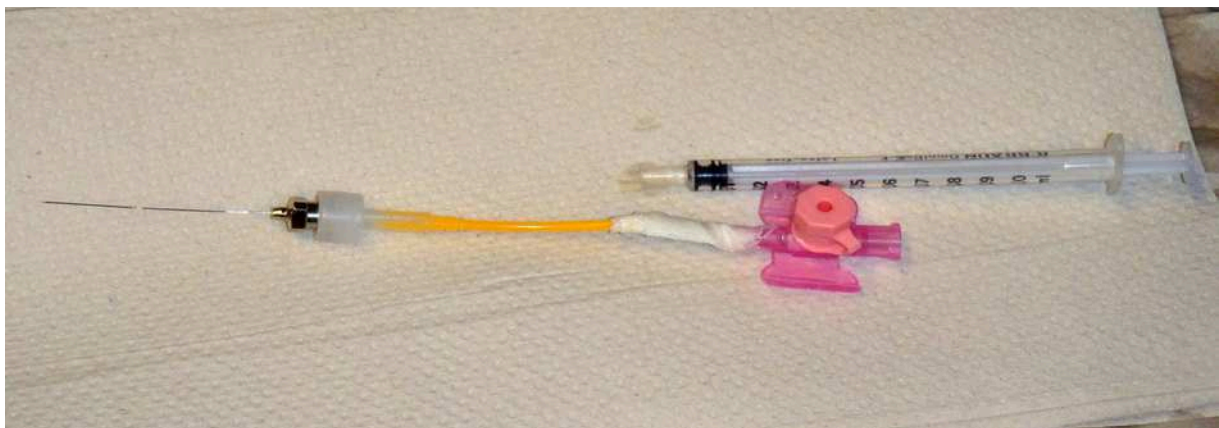


Abbildung 9: Instrumente zur unilateralen Nierenarterienperfusion

20G Felxüle adaptiert an eine Perfusorleitung via Luer-Lock an einer Edelstahlkanüle Spitze, 25 mm OD

Nierenentnahme

Die anästhesierten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, auf einer Werkbank mit Pins auf einer desinfizierten Unterlage an den Extremitäten befestigt und laparotomiert. Beide Nieren wurden entnommen und nach Entfernung der Nierenkapsel in jeweils drei Querteile geteilt. Der obere Nierenpol diente zur RNA-Isolation und späteren RT-PCR Auswertung und wurde unverzüglich in ein Eppendorf-Gefäß mit 600 µl RNAlater überführt. Der mittlere Querteil der Niere war zur Gewinnung histologischer Schnittpräparate vorgesehen und wurde in speziellen Histo-Kassetten mittels einer 4%-igen Formalinlösung fixiert. Der untere Nierenpol wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder für die elektronenmikroskopische Auswertung genutzt.

2.2.6 Studiendesign zum Nachweis einer Histon-induzierten Nierenschädigung

Unilaterale Nierenarterienperfusion mit Histonen ohne LPS-Vorstimulation

Um die pro-entzündlichen Effekte von Histonen zu evaluieren wurden jeweils fünf männlichen C57BL/6-Mäusen im Alter von 6-8 Wochen unbehandelte extrazelluläre Histone (10 mg/kg KG) und mit Proteinase K vorverdaute Histone (10 mg/kg KG) direkt in die linke A. renalis injiziert. Bei den extrazellulären Histonen handelte es sich um ein fertiges Präparat aller Histon-Klassen, „Total Histones“, welches aus dem Thymus von Kälbern gewonnen wurde. Die Hälfte der Histone wurde vor der Injektion in vitro mit Proteinase K vorbehandelt, was zu einer Destruktion der histonspezifischen Proteinstruktur führen sollte. Hierfür wurden 500 µl Histone (2 mg/ml) mit 50 µl Proteinase K (1 mg/1,5 ml) gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Da Proteinase K unabhängig von Histonen in aktiver Form ebenfalls zu Zellschäden der Niere führen könnte, wurde das Gemisch aus zersetzten Histonen und Proteinase K im Anschluss in vitro mit 100 µg/ml Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) behandelt und das entstandene Gesamt-Gemisch aus Histonen, Proteinase K und Protease-Inhibitor den Mäusen verabreicht. Hierfür wurde die Methode der unilateralen Nierenarterienperfusion verwendet (s.o.). In allen hier aufgeführten Experimenten wurde jeweils nur die linke Niere mit der Testsubstanz perfundiert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und beide Nieren entnommen.

Unilaterale Nierenarterienperfusion mit Histonen nach LPS-Vorstimulation

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 12 Stunden vor der Nierenarterienperfusion jeweils 20 männliche Wildtyp C57BL/6-Mäuse und 10 männliche *Tlr2/4* Doppel-Knockout-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen mit intraperitoneal verabreichtem, niedrig dosiertem LPS (1mg/kg KG) vorbehandelt. Der Eingriff der unilateralen Nierenarterienperfusion erfolgte wie unter „unilaterale arterielle Perfusion der Niere“ in Methoden 2.2.5 beschrieben.

- Nierenarterienperfusion mit physiologischer Kochsalzlösung bei Wildtyp-Mäusen
5 Wildtyp-Mäusen wurde als Kontrolle 0,9%ige isotonische Kochsalzlösung in die linke Nierenarterie injiziert.
- Nierenarterienperfusion mit unbehandelter Histonen bei Wildtyp-Mäusen
10 der Wildtyp-Mäuse erhielt eine Injektion von unbehandelten „Total Histones“ (10 mg/kg KG) in die linke Nierenarterie.
- Nierenarterienperfusion mit APC-inkubierten Histonen bei Wildtyp-Mäusen
Weitere 10 Wildtyp-Mäusen wurden stattdessen mit Histonen injiziert, die zuvor für eine Stunde bei 37 °C mit 500 nM aktiviertem Protein C (APC) inkubiert worden waren.
- Nierenarterienperfusion mit unbehandelten Histonen bei *Tlr2/4* Knockout-Mäusen
Alle 10 *Tlr2/4* Doppel-Knockout-Mäuse wurden ebenfalls mit 1 mg/kg KG LPS vorbehandelt und erhielten 12 Stunden später eine Injektion von unbehandelten „Total Histones“ (10 mg/kg KG) in die linke Nierenarterie.

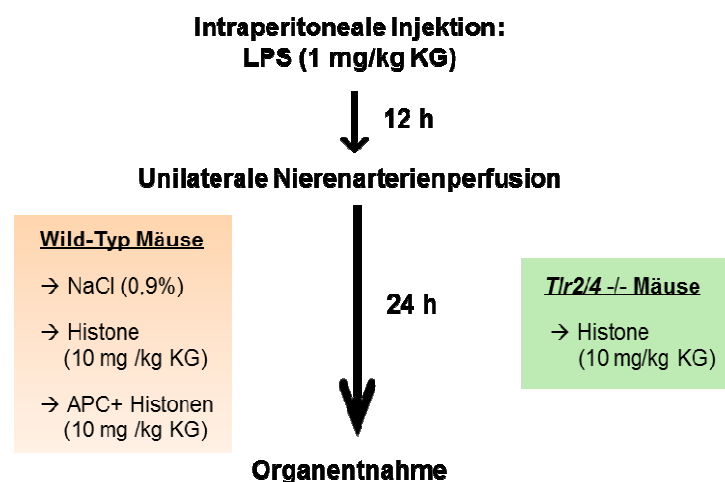


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur unilateralen Nierenarterienperfusion

24 Stunden nach der unilateralen Nierenarterienperfusion wurden sowohl Wildtyp, als auch *Tlr2/4* Doppel-Knockout-Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und beide Nieren entnommen wie unter Methoden 2.2.5 „Nierenentnahme“ beschrieben.

2.2.7 Studiendesign zum Einfluss von Histonen auf die Leukozytentransmigration

Alle in dieser Arbeit gezeigten intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin in Großhadern, München. Der operative Eingriff am Kremastermuskel der Maus wurde von Herrn Dr. med. Christoph Reichel und Bernd Uhl durchgeführt, denen an dieser Stelle mein ausdrücklicher Dank gilt. Die verwendeten Methoden zur Darstellung von Leukozytenmigration und Endothelpermeabilität wurde an sechs Wochen alten, männliche C57BL/6-Mäusen durchgeführt und verlief analog zu früheren Studien (121, 122). Alle Versuchstiere wurden 12 Stunden vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung mit intraperitoneal injiziertem, niedrig dosiertem LPS (1mg/kg KG) vorbehandelt. Jeweils sechs Mäuse einer Gruppe wurden durch intraskrotale Injektion mit Histonen (500 µg), mit 500 nM APC-inkubierten Histonen (500 µg) oder zur Kontrolle mit phosphatgepufferter Salzlösung behandelt. Sechs Stunden später bestimmte man die Anzahl rollender Leukozyten, fest adhärenter Leukozyten und transendothelial migrierter Leukozyten anhand von intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen an postkapillären Venolen des Kremastermuskels. Wasserimmersionslinsen (20x/Numerische Apertur 0.5 und 40x/NA 0.8) ermöglichten die Aufnahme hochwertiger Bilder. Zur quantitativen Analyse der Leukozytenmigrations-Parameter wurde die Cap-Image Software herangezogen. Hierbei wurden Leukozyten als fest adhärent definiert, die länger als 30 Sekunden am Gefäßendothel haften blieben, während transendothelial migrierte Leukozyten in Bereichen besonderen Interesses bei einer Entfernung von maximal 75 µm der jeweiligen Gefäßwand über eine Gefäßlänge von 100 µm gezählt wurden. Zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit wurden grün fluoreszierende Mikrosphären über einen arteriellen Katheter injiziert und deren Passage durch die jeweiligen Gefäße mit Hilfe eines FITC Filterblocks unter stroboskopischer Illumination (Exposition 1 ms, Zykluszeit 10 ms,

Wellenlänge 488 nm) ermittelt. Neben der Leukozytenmigration wurde auch die transendotheliale Permeabilität *in vivo* bestimmt. Hierfür wurde den Mäusen sechs Stunden nach der Histon-Stimulation 5mg in physiologischem Kochsalz gelöstes und mit FITC markiertes Dextran intraarteriell injiziert. Nach weiteren 30 Minuten wurden fünf postkapilläre Gefäß-Segmente, sowie das umgebende perivaskuläre Gewebe durch Lichteinstrahlung der Wellenlänge 488 nm angeregt und deren Emission bei 515 nm mit einer CCD-Kamera unter Verwendung eines entsprechenden Emissionsfilters (LP 515) aufgezeichnet. In sechs zufällig ausgewählten Bereichen ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$), die in einem Radius von 50 μm von der untersuchten Venole entfernt lagen, wurde jeweils der Mittelwerte der Fluoreszent-Intensität durch digitale Bildanalyse berechnet. Die phänotypische Darstellung der transmigrierten Leukozyten erfolgte durch Paraffin eingebettete, immunhistochemisch gefärbte Gewebsschnitte unter Verwendung von Ratten-anti-Maus CD45, Ly6G oder F4/80 mAb und der Kontrastfärbung mit Mayer's Hämalaun (123).

2.2.8 Studiendesign zur Wirkung von anti-Histon IgG bei akuter Nierenschädigung

Wirkung von anti-Histon IgG bei ischämischer Nierenschädigung

Der operative Eingriff zur Induktion der renalen Ischämie wurde freundlicherweise von meinen Laborkollegen Dr. Shrikant Mulay nach der Methode von Lech et al. vorgenommen (124). Zur Induktion einer akuten ischämischen Nierenschädigung wurden 20 Wildtyp C57BL/6-Mäusen unter Allgemeinanästhesie durch einen 1 cm langen Flankenschnitt beide Nierenarterien freigelegt und für jeweils 30 Minuten bilateral abgeklemmt. Die Körpertemperatur wurde durch Heizplatten kontinuierlich bei 37 °C gehalten und regelmäßig durch ein rektales Thermometer überprüft. Nach Entfernung der Klammern wurde die wieder einsetzende renale Durchblutung inspiziert und die Inzision durch eine Wundnaht verschlossen. Unmittelbar nach Abschluss der Operation erfolgte eine intraperitoneale Injektion von jeweils 20 mg/kg/KG des anti-Histon IgGs BWA3 oder des Kontroll-IgGs. 24 Stunden später wurden die Mäuse wie unter „Nierenentnahme“ in Methoden 2.2.5 beschrieben getötet und beide Nieren zur histologischen Auswertung und RNA-Isolation entnommen.

Protektiver Effekt bei Endotoxin-induzierter Nierenschädigung

Zur Induktion einer akuten septischen Nierenschädigung wurden 6-8 Wochen alten Wildtyp C57BL/6-Mäusen intraperitoneal 10 mg/kg KG LPS injiziert. Eine Hälfte der Mäuse wurde zwei Stunden früher mit 20 mg/kg KG des anti-Histon Antikörper BWA3 i.p. vorbehandelt, die andere Hälfte der Mäuse erhielt stattdessen 20 mg/kg KG Kontroll-IgG. 12 Stunden danach wurde den betäubten Mäusen wie unter Methoden 2.2.5 beschrieben orbital Blut abgenommen und nach Tötung der Mäuse beide Nieren zur histologischen Auswertung entnommen.

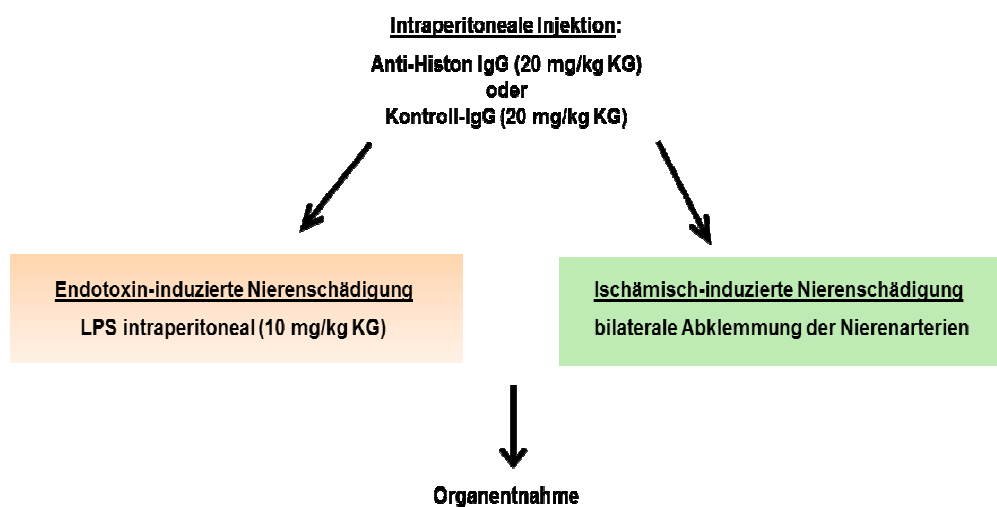


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Nephroprotektion mit anti-Histon IgG

2.2.9 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde die RNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer und chemotaktischer Zytokine, sowie die RNA-Expression anderer Marker einer akuten Nierenschädigung oder Entzündungsreaktion analysiert. Hierfür wurde RNA aus Nierengewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels real-time PCR quantifiziert.

Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung aus dem Nierengewebe erfolgte mittels PureLink® RNA Mini Kit entsprechend der Angaben des Herstellers. Es wurde an einem RNase- freien Arbeitsplatz gearbeitet um die Zersetzung der RNA durch RNAsen zu minimieren. Nach der

Organentnahme wurden die Kapseln der Nieren entfernt, die Nieren zerteilt und jeweils der obere Pol zur RNA-Isolierung in 500 µl RNAlater-Lösung bei -20°C gelagert. Die Nierenstücke wurden bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Zur Lyse der Proben wurde β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 in RLT-Lyse-Puffer verdünnt und jeweils 500 µl dieser Lösung mit 30 mg Gewebe für 30 Sekunden mit Hilfe eines Homogenisators vermengt. Nachdem die homogenisierten Proben 3,5 Minuten bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert wurden, entnahm man 350µl des Überstands, verdünnte diesen mit 350µl 70%igen Ethanol und vortexte die entstandene Lösung anschließend gründlich. Danach wurden die gewonnenen 700 µl auf RNA-Mini-Säulen pipettiert und 15 Sekunden lang bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Dabei wurde die RNA durch die Membran aufgefangen, während das Filtrat am Gefäßboden verworfen werden konnte. Als nächsten Schritt wurde der Alkohol ausgewaschen. Hierfür pipettierte man 700 µl Wasch-Puffer-1 auf die Säulen und zentrifugierte diese im Anschluss erneut für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen/Minute. Es erfolgten noch zwei Waschvorgänge mit einem zweiten Wasch-Puffer, der zuvor im Verhältnis 1:4 mit 100%igem Ethanol vermischt wurde. Je 500 µl Wasch-Puffer-II wurde auf die einzelnen Säulen gegeben und diese für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Waschung wiederholt, wobei nun für zwei Minuten zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Um die letzten Reste von Ethanol zu entfernen wurden die Säulen für weitere zwei Minuten bei 14.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und in sterile Eppendorf-Gefäße überführt. Letztlich wurde die in den Säulen verbliebene RNA mit 33 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nach zwei Minuten Inkubationszeit weitere zwei Minuten bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die RNA wurde dadurch aus der Membran der Säulen gelöst und in die Eppendorf-Gefäße gespült. Das Material konnte ggf. bei -20°C für einige Monate aufbewahrt werden.

Messung der Konzentration und Reinheit der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm unter Verwendung eines NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers bestimmt. Hierfür wurde 1 µl aus der frisch isolierten, unverdünnten RNA-Lösung entnommen und auf den Probenhalter aufgetragen. Die Reinheit der Probe

wurde anhand des Extinktionsverhältnisses von OD260nm/OD280nm ermittelt. Nur bei einer Relation von 1,6 bis 2,2 wurde die Probe als rein betrachtet und weiter zur cDNA-Synthese verwendet. Werte unterhalb von 1,6 deuteten auf eine Protein-Kontamination hin, während Werte über 2,2 auf eine DNA-Kontamination hinwiesen. Um für weitere Arbeitsschritte die unterschiedlichen Konzentrationen aneinander anzugleichen, wurden die Proben der frisch isolierten RNA-Lösung mit der jeweils entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser verdünnt.

Umschreibung der RNA in cDNA (reverse Transkription)

Zur Umschreibung der RNA in complementary-Einzelstrang-DNA (cDNA) wurden zwei Gemische angesetzt: cDNA-RT(+) enthält reverse Transkriptase für die cDNA-Synthese, während cDNA-RT(-) keine reverse Transkriptase enthält und als Negativkontrolle zur Überprüfung von cDNA-Kontaminationen dient. Zunächst wurde ein „Mastermix“ aus folgenden Bestandteilen angesetzt: 4,5 µl 5xFirst-Strand-Buffer, 1 µl 0,1M DTT, 0,45 µl 25 mM dNTP-Mischung, 0,25 µl Linear-Acrylamid (15µg/ml), 0,25 µl Hexanukleotide und 0,5 µl RNasin. Für jede RT(+)Probe wurde 2 µg RNA-Lösung mit 16,5 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 6,95 µl Mastermix vermengt. Im Gegensatz zu den RT(-)Proben wurde zuletzt noch 0,5µl reverse Transkriptase (Superscript II) hinzugefügt. Für jede RT(-) Probe wurde 1,5 µl der RNA-Lösung mit 14 µl RNase-freiem Wasser und 6,95 µl Mastermix vermischt. Alle Proben wurden 90 Minuten bei 42°C im Thermomixer inkubiert, wobei in den RT(+) Proben die Umschreibung von RNA in cDNA stattfinden sollte. Im Anschluss wurde die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C beendet. Es folgte eine kurze Zentrifugation der Proben bei 10.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert um das Kondensat vom Deckeluntergrund zu lösen. Die gewonnene cDNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) dient der Amplifikation von spezifischen Nukleinsäuren und ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Dabei wird die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die in „Echtzeit“ (real time) schon während eines PCR-Zyklus am Ende der Elongation erfasst werden. In dieser Arbeit basiert das Verfahren auf der

Messung des interkalierenden DNA-Farbstoffes SYBR Green I. Indem der Farbstoff sich in die DNA-Doppelstränge einlagert, steigt deren Fluoreszenz, die so mit der Zunahme der replizierten Ziel-DNA korreliert und direkt gemessen werden kann. Aus dieser Messung kann man auf die ursprüngliche cDNA-Ausgangsmenge und deren RNA Korrelat zurückschließen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Lightcycler® 480 Real-Time PCR System von Roche verwendet. Zunächst erfolgte die Vorbereitung eines sog. „SYBR-Green Mastermixes“, bestehend aus 1 ml 10x-Taq-Puffer ohne Detergenzien, 75 µl dNTPs (25 mM), 2 ml PCR-Optimizer, 100 µl BSA-PCR (20 mg/ml), 20 µl SYBR-Green I (1:100; 20% DMSO) und 1,2 ml Magnesiumchlorid (25 mM). 10 µl dieses „SYBR-Green Mastermixes“ wurden mit 0,16 µl Taq-Polymerase, 6,64 µl Wasser, sowie je 0,6 µl des gewünschten Forward-Primers und Reverse-Primers (300 nM) vermengt, wodurch man einen spezifischen „Primer-Mix“ für das jeweils entsprechende Gen erhielt. Jeweils 18 µl dieses „Primer-Mixes“ wurden in die linke Ecke jedes Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Im Anschluss wurden in die rechte Ecke jedes Wells 2 µl der im Verhältnis 1:10 verdünnten cDNA-RT(+)Proben bzw. cDNA-RT(-)Proben pipettiert, wodurch sich insgesamt ein Volumen von 20 µl pro Well ergab. Die räumliche Trennung von „Primer-Mix“ und cDNA während des Pipettierens diente vor allem zur Vorbeugung einer eventuellen Verunreinigung der cDNA. Die cDNA-RT(-) wurde verwendet um auf unspezifische DNA-Amplifikation zu testen. Waren Ergebnisse der Negativkontrolle positiv, so konnten diese nicht verwendet werden. Auf derselben Platte wurde zusätzlich zum jeweils gewünschten Gen ebenfalls das Housekeeping-Gen 18S rRNA als Referenz untersucht, indem ein Mix für dessen spezifische Primer mit der entsprechenden cDNA-Probe in ein Well pipettiert wurde. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Expression der Ziel-RNA jeweils im Verhältnis zur 18s-rRNA-Expression der entsprechenden Probe betrachtet. Nachdem Beenden des Pipettiervorgangs wurde die Platte umgehen mit einer Folie verschlossen und bei 4 °C für 1,5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und zur quantitative real-time PCR-Analyse in den Roche Lightcycler® 480 überführt. Der Durchlauf einer Platte dauerte eine Stunde und 15 Minuten. Zu Beginn erfolgte eine Präinkubationsphase von fünf Minuten bei 95°C um die vollständige Denaturierung der templatens Anfangs-DNA zu erreichen. Im Anschluss folgten 40 PCR-Zyklen bestehend aus der permanenten Wiederholung der gleichen Abläufe. Als erstes wurden die DNA-Doppelstränge bei 95 °C denaturiert, so dass sich bei Senkung der Temperatur auf 60°C

die verwendeten Forward- und Reverse-Primer an die jeweils komplementären DNA-Einzelstränge anlagern konnten. Während die Temperatur wieder auf 95°C erhöht wurde lagerten sich Nukleotide nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die Matrizen-DNA an und wurden mit Hilfe der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase miteinander verbunden. Im Anschluss an diese sog „Elongation“ wurde ein neuer Zyklus eingeleitet. Am Ende eines jeden Zyklus hatte sich die DNA entsprechend verdoppelt und es erfolgte eine Quantifizierung der vorliegenden DNA-Menge mittels Fluoreszenz-Messungen (125).

Nach der durchgeführten qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Primerspezifität durchgeführt. Im Verlauf einer stetigen Temperatursteigerung auf bis zu 95°C wurden die einzelnen DNA-Doppelstrangfragmente bei einer jeweils spezifischen Schmelztemperatur denaturiert, was sich anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität quantifizieren ließ. Im Idealfall waren die Schmelzeigenschaften eines Primers insoweit identisch, dass sich bei der Analyse der Schmelzkurve nur ein Peak abzeichnete. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve spiegelte dabei annähernd die Menge des gebildeten Fragments wieder, was eine Unterscheidung zwischen doppelsträngiger DNA von spezifischen PCR-Produkten und unspezifischen Primer-Dimeren ermöglichte (126).

2.2.10 Histologie

Färbungen

Die histologischen Färbungsverfahren wurden freundlicherweise von Frau Janina Mandelbaum und Herrn Dan Draganovici durchgeführt, denen ich für diese Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte.

- Paraffineinbettung

Zur histologischen Auswertung wurde Gewebe aus dem mittleren Nierenabschnitten entnommen um daraus zunächst Paraffinschnitte anzufertigen. Dafür wurde das zu untersuchende Nierengewebe umgehend nach der Organentnahme in Histologie-Kassetten überführt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur mit 4%iger Formalinlösung inkubiert. Die fixierten Proben wurden daraufhin mittels eines Gewebeeinbettautomats durch eine ansteigende Alkoholreihe und Xylen dehydriert und in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach

dem Erstarren zu festen, schneidbaren Blöcken wurden 2µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf speziell für die Immunhistologie mit 3-Aminopropyltriethylsilan (APES) beschichtete Objektträger übertragen und für zwölf Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte durch die Behandlung mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit destilliertem Wasser rehydratisiert.

- Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung

Die Histologische Darstellung der Tubulusschädigung erfolgte anhand von Schnitten der Niere, die mittels PAS-Reaktion gefärbt wurden. Die PAS-Färbung dient zum histochemischen Nachweis von Molekülen mit zahlreichen Kohlehydratresten wie Glykogen, Glykoproteine, Mukopolysaccharide und Glykolipide und beruht auf der Reaktion von Periodsäure mit Glykolgruppen von Kohlehydratresten und dem Schiffschen Reagenz. Periodsäure (HIO₄) oxidiert dabei die freien OH-Gruppen der 1,2-Gykole (-HCOH-HCOH-) zu Aldehyden. Diese Aldehyde reagieren mit dem Schiffschen Reagenz, einer fuchsin-schwefeliger Säure, indem sie das Sulfit binden und so den Farbstoff Fuchsin freisetzen, der die PAS typische rot-violette Färbung hervorruft. PAS-positiv reagieren unter anderem neutrale Muzine, die Basalmembran und das renale Tubulussystem. Die Zellkerne färben sich durch die PAS-Reaktion in der Regel blau-violett. Zur Durchführung der eigentlichen PAS-Färbung wurden die Schnitte nach dem Entparaffinierungs- und Rehydratationsvorgang nach folgendem Protokoll mit verschiedenen Lösungen inkubiert: Danach wurden die Gewebsschnitte kurz in 95%igen Alkohol getaucht und mit einem Deckglas abgedichtet.

- TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) –Färbung

Die von Gavrieli et al. entwickelte TUNEL-Methode dient zum Nachweis der DNA-Fragmentierung im Zellkern und wird zur Darstellung apoptotischer Zellen genutzt. Hierbei werden durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) die freien Hydroxygruppen (3'OH-Enden) von DNA-Fragmenten mit dem modifizierten Nucleotid Fluorescein-dUTP markiert (127). In dieser Arbeit wurde das In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein von Roche Diagnostics zur TUNEL-Färbung des Nierenparenchyms verwendet. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden in Paraffin eingebettete Nierenschnitte wie unter Methoden 2.2.10 „Paraffineinbettung“ beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Zur Freilegung der Zellkerne wurden die Präparate 10 Minute bei 37°C mit Proteinase K-

Lösung (20 µg/ ml Proteinase K in 10mM Tris/HCl) inkubiert und zweimal für 5 Minuten mit 0,1M PBS gewaschen. Daraufhin wurden 50 µl TUNEL-Reaktions-Mischung (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein), bestehend aus Enzym- und Färbelösung, auf jeden Nierenschnitt gegeben und für 60 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zur anschließenden Reinigung wurden die Präparate dreimal für 5 Minuten mit 0,1 M PBS gewaschen.

- Immunhistochemische Färbung der neutrophilen Granulozyten

Zur immunhistochemischen Färbung der neutrophilen Granulozyten wurde zunächst wie beschrieben Gewebe des mittleren Nierenabschnitts in Paraffin eingebettet, in 2µm dünne Scheiben geschnitten und im Anschluss entparaffiniert. Daraufhin erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase, indem die Schnitte für 20 Minuten in 20 ml einer Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung im Dunkeln inkubiert und zweimal für fünf Minuten in PBS geschwenkt wurden. Im nächsten Schnitt wurde die Demaskierung des Antigens durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in einer Lösung aus je 300 ml destilliertem Wasser und 3 ml Antigen Unmaskierung-Solution eingelegt und in der Mikrowelle für 10 Minuten zum Kochen gebracht. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur und dem erneuten Waschen in PBS erfolgte die Detektion des Antigens. Zunächst wurde dafür das endogene Biotin blockiert, indem die Schnitte erst für 15 Minuten in einem Tropfen Avidin und im Anschluss für weitere 15 Minuten in einem Tropfen Biotin-inkubiert wurden. Dann wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörpern inkubiert. Ratten anti-Maus Neutrophile-Antikörper (1:400) dienten zur Markierung der Neutrophilen. Bei der hier angewandten Avidin-Biotin-Komplex (ABC) -Methode wird die starke Affinität von Avidin für Biotin genutzt, um mit Peroxidase markierte Avidin-Biotin-Komplexe an biotinylierte sekundäre Antikörper zu binden. Nach erneutem Schwenken in PBS für 10 Minuten erfolgte die Zugabe des biotinylierten sekundären Antikörpers, einem entsprechenden anti-Ratte IgG (1:300 in PBS). Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurde die Schnitte wieder für 10 Minuten in PBS gewaschen und im Anschluss weitere 30 Minuten mit einer ABC-Substrat-Lösung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Gegenfärbung mit Methylgrün wurde die überflüssige Farbe mit einer aufsteigenden Alkoholreihe ab 95% und Xylol ausgewaschen und die Schnitte mit VectaMount eingedeckt.

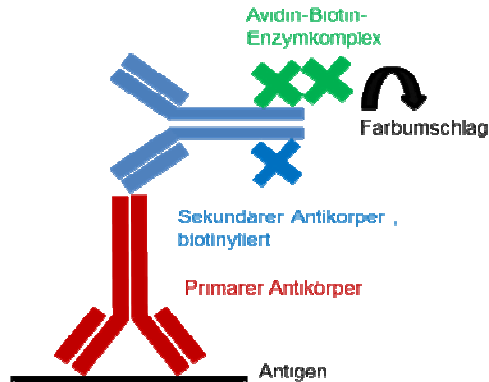


Abbildung 12: Schematische Darstellung der ABC-Methode

Der primäre Antikörper bindet an das Antigen. Der biotinylierte, sekundäre Antikörper bindet an das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Das Enzym-markierte Avidin-Biotin-Komplex-Substrat bindet an den biotinylierten, sekundären Antikörper und löst die Farbreaktion aus.

Transmissionselektronenmikroskopie

2 mm große Gewebeproben des unteren Nierenpols wurden entnommen und in einer modifizierten Karnovsky Lösung aus 3% Glutaraldehyd und 1% Paraformaldehyd in 0,1M PBS Puffer (PH 7,4) fixiert. Die transmissionselektronenmikroskopische Aufarbeitung der Nierenproben wurde freundlicherweise von Helen Liapis im Pathologischen Institut der Washington University, St. Louis, USA, nach der geläufigen Standardmethode wie in (128) beschrieben durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bildaufnahmen wurden mit dem JEOL 1200 EX Elektronenmikroskop bei 37500-facher Vergrößerung aufgenommen.

Histologische Auswertung

- Semi-quantitative Auswertung der Tubulusschäden

Die Beurteilung des Tubulusschadens erfolgte anhand von PAS-Schnitten unter dem Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung. Zur semi-quantitativen Evaluation wurde ein „Tubular Injury Score“ verwendet, wobei folgende Kriterien in die Beurteilung einfließen: Tubuluszellnekrose, Verlust des Bürstensaums, Dilatation des Tubuluslumens (Ballonierung), Vakuolisierung und luminale Zylinderformationen. Für jede Maus wurde ein PAS-Schnitt ausgewertet, indem bei einer 200-fachen Vergrößerung acht Abschnitten des kortikomedullären Übergangs anhand des prozentualen Tubulusschadens Score-Punkte zugeordnet wurden, wobei ein Scorewert von null einem intaktem Tubulussystem ohne Schädigung und ein Wert von fünf einer massiven Zerstörung der Tubuli entspricht. Die

exakte Zuordnung der prozentualen Tubulusschädigung zum entsprechenden Score-Wert lautete wie folgt: 0, keine; 1, <10%; 2, 10–25%; 3, 26–45%; 4, 46–75%; und 5, >75% geschädigte Tubuli (129). Die Score-Werte aller acht Einzelabschnitte eines Schnittes wurden gemittelt und hieraus der Mittelwert einer Gruppe errechnet und graphisch dargestellt.

- Quantitative Evaluation der Infiltration neutrophiler Granulozyten

Die immunhistochemisch gefärbten Neutrophilen eines Gesichtsfelds bei einer 200-fachen Vergrößerung wurden unter dem Lichtmikroskop manuell ausgezählt. Hierfür wurden die 10 Gesichtsfelder mit der höchsten Zelldichte, sog. High-Power-Fields“ (hpf) ausgewählt und die durchschnittliche Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld für jeden Schnitt bestimmt. Die Ergebnisse der Schnitte einer Gruppe wurden gemittelt.

- Quantifizierung apoptotischer Zellen

Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch manuelle Zählung TUNEL-gefärbter Zellkerne mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 500nm und einer Emissionswellenlänge von 540nm (grün) bei 100-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse der Schnitte einer Gruppe wurden gemittelt und mit anderen Gruppen verglichen.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die einzelnen Gruppen wurden mittels zweiseitig gepaartem Student's t-test verglichen. Tierexperimente bestanden je nach Versuch aus mindestens 5 Mäusen pro Gruppe. Bei Zellkulturversuchen bezogen sich die dargestellten Ergebnisse auf Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die präsentierten Daten sind in den Grafiken als Mittelwerte \pm standard error of the mean (SEM) dargestellt. Bei einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Die Bezeichnung eines signifikanten Unterschieds im Fließtext ist einer statistischen Signifikanz gleichzusetzen. In den Grafiken wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ mit „*“, $p \leq 0,01$ mit „**“ und $p \leq 0,001$ mit „***“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Extrazelluläre Histone wirken zytotoxisch auf murine renale Zellen

3.1.1 Effekte extrazellulärer Histone auf murine glomeruläre Endothelzellen

Um die toxischen Effekte von Histonen auf renale Zellen in vitro zu evaluieren wurden murine glomeruläre Endothelzellen in Konzentrationen zwischen 5 und 300 µg/ml mit einem Gemisch aller bekannter Histone („Total Histones“) für 24 Stunden inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem MTS-Assay bestimmt. Als negative Kontrolle für einen schädigenden Effekt diente 10% und 30% FCS. Zusätzlich wurde der Effekt verschiedener TLR2, TLR4 und TLR9 Agonisten wie LPS, CpG, Pam3 auf die Viabilität glomerulärer Zellen getestet.

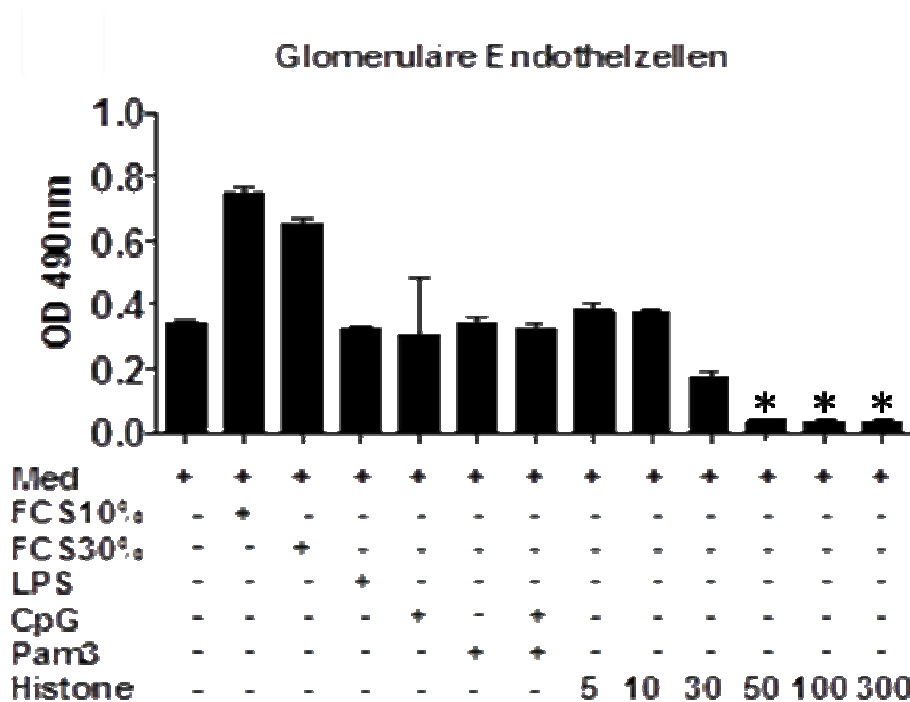


Abbildung 13: Toxische Effekte von extrazellulären Histonen auf murine glomeruläre Endothelzellen

Stimulation muriner glomerulärer Endothelzellen (GEnc) mit Histonen und TLR-Rezeptor Agonisten: GEnc wurden in 96-well Platten in RPMI Medium kultiviert und für 24 Stunden mit verschiedenen Substanzen inkubiert: FCS 10%, FCS 30%, LPS 3 µg/ml, CpG 6 µg/ml, Pam3CSK 3 µg/ml, CpG 6 µg/ml + Pam3CSK 3 µg/ml, Histone (5µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 300 µg/ml). Die Daten stellen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * p < 0.05 vs. Medium

Dabei zeigte sich, dass Histone in ansteigender Konzentration zwischen 10 und 50 µg/ml einen zunehmend toxischen Effekt auf glomeruläre Endothelzellen ausüben. Toxische Effekte waren bei den TLR2-, TLR4- und TLR9-Agonisten nicht nachweisbar (Abbildung 13).

3.1.2 Effekte extrazellulärer Histone auf murine tubuläre Epithelzellen

Auch die Histon-Sensitivität primär isolierter muriner tubulärer Epithelzellen (TEC) wurde getestet, indem nach 24-stündiger Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von Histonen („Total Histones“) zwischen 5 und 100 µg/ml die Zellviabilität mittels MTS-Assay bestimmt wurde. In diesen Experimenten wurde nachgewiesen, dass auch die Viabilität von tubulären Epithelzellen mit ansteigender Histon-Konzentration negativ beeinflusst wird (Abbildung 14). Somit wirken extrazelluläre Histone sowohl auf murine glomeruläre Endothelzellen, als auch auf murine tubuläre Epithelzellen zytotoxisch.

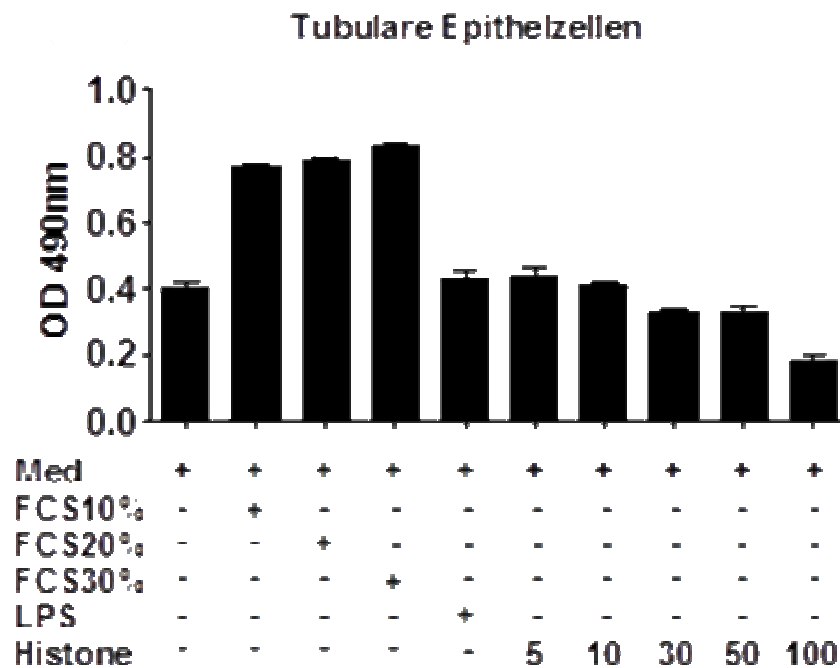


Abbildung 14: Toxische Effekte von extrazellulären Histonen auf murine tubuläre Epithelzellen

Stimulation primärer muriner tubulärer Epithelzellen (TEC) mit aufsteigenden Histon-Konzentrationen: TEC wurden in 96-well Platten in RPMI Medium kultiviert und für 24 Stunden mit FCS (10%, 20%, 30%), LPS 3 µg/ml und unterschiedlichen Histon-Konzentrationen (5, 10, 30, 50, 100 µg/ml) inkubiert. Die Daten stellen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM dar. * p < 0.05 vs Medium

3.2 Extrazelluläre Histone aktivieren renale dendritische Zellen via TLR2 und TLR4

Die Stimulation dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark mit P3C und LPS als Agonisten für TLR2 und TLR4 resultiert in einem Dosis-abhängigen Anstieg von IL-6 (130). Es galt nun zu überprüfen, ob auch die Stimulation renaler dendritischer Zellen mit extrazellulären Histonen in vitro über TLR2- und TLR4-abhängige Signalweg zur Ausschüttung von IL-6 und anderen inflammatorischen Zytokinen führt. Hierfür wurden primär isolierte renale dendritische Zellen von *TLR2/4* $-/-$ und Wildtyp-Mäusen 24 Stunden mit ansteigenden Histon-Konzentrationen (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS als Kontrolle stimuliert. Der Zellüberstand wurde mittels ELISA auf IL-6 untersucht. Die Histon-Stimulation des Überstands von primären renalen dendritischen Zellen, welche aus Wildtyp-Mäusen gewonnen wurden, führte zu einem Dosis-abhängigen Anstieg der Konzentration von IL-6.

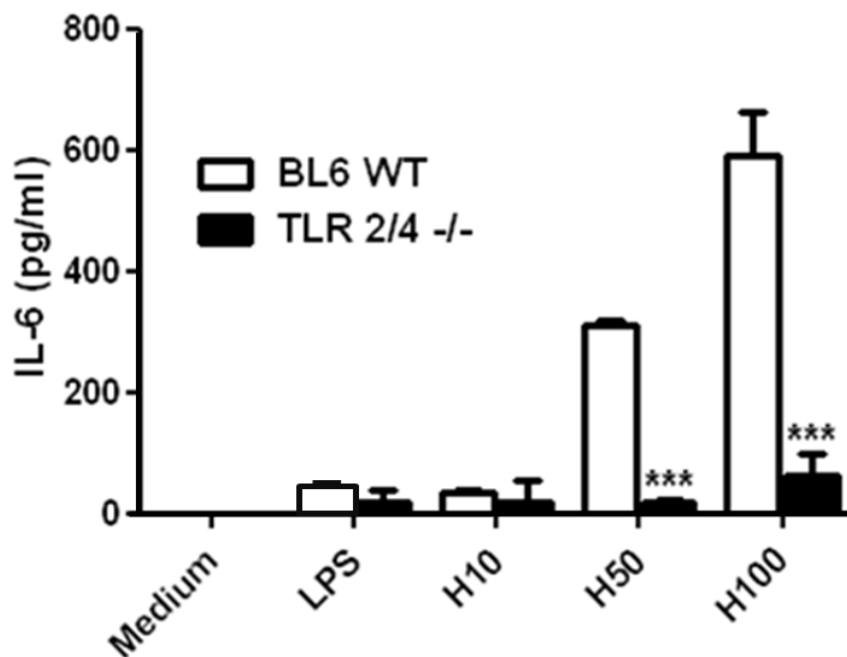


Abbildung 15: TLR 2/4-abhängige Produktion von IL-6 nach Histon-Stimulation renaler dendritischer Zellen

Primär isolierte renale dendritische Zellen (rDCs) aus *TLR 2/4* $-/-$ oder Wildtyp-Mäusen wurden in aufsteigender Konzentration mit Histonen (Dosisangaben in $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Als Kontrolle diente eine Stimulation mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Konzentrationen von IL-6 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente \pm SEM dar *** $p < 0.001$ *Tlr2/4* $-/-$ vs. Wildtyp.

Im Vergleich dazu fiel die nach Histonstimulation nachweisbare Konzentration von Il-6 im Überstand renaler dendritischer Zellen aus *Tlr2/4* doppelt-defizienten Mäusen signifikant ($p < 0,001$) geringer aus (Abbildung 15). Dies lässt vermuten, dass extrazelluläre Histone über die Aktivierung von TLR2 und TLR4 in renalen dendritischen Zellen die Produktion inflammatorischer Zytokine wie Il-6 induzieren und über diesen Mechanismus an der Immunstimulation im Rahmen der Zellschädigung bei akuter Nierenschädigung beteiligt sind.

3.3 Extrazelluläre Histone steigern die Leukozytendiapedese

Zum Nachweis einer immunstimulatorischen Komponente von Histonen in vivo wurde eine Histon-induzierte Stimulation der Leukozytendiapedese und transendotheliale Permeabilität in Mäusen untersucht. Dafür wurde Mäusen Histone („total Histones“), mit APC vorverdaute Histonen (Histone + APC) oder PBS (Kontrolle) intraskrotal injiziert und 6 Stunden danach intravitalmikroskopische Videoaufnahmen postkapillärer Venolen des Kremastermuskels von C57BL/6-Mäuse vorgenommen. Es erfolgte eine Analyse hinsichtlich der Adhäsion, Transmigration und Rollgeschwindigkeit der Leukozyten, sowie des transvaskulären Durchtritts des Polysaccharids Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Dextran.

Das beschriebene intravitalmikroskopische Verfahren wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Christoph Reichel und Bernd Uhl im Labor von Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr med. habil. Fritz Krombach durchgeführt, denen hierfür mein besonderer Dank gilt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, welche mit Kochsalzlösung (PBS) behandelt wurde, eine signifikante ($p < 0.05$) Steigerung der Leukozytenadhäsion und -transmigration durch Histone. Dieser Effekt war bei Histonen, welche vor der Injektion mit APC gespalten worden waren, signifikant reduziert. Die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten wurde dahingegen durch die Gabe von Histonen kaum beeinflusst (Abbildung 16, A-C).

Des Weiteren wurde mit Hilfe intravitalmikroskopischer Verfahren der transvaskuläre Durchtritt von FITC-markiertem Dextran gemessen, wodurch die transendotheliale Permeabilität in vivo beurteilt werden konnte. Nach intraskrotaler Injektionen von extrazellulären Histonen („total Histones“) trat innerhalb von sechs Stunden statistisch

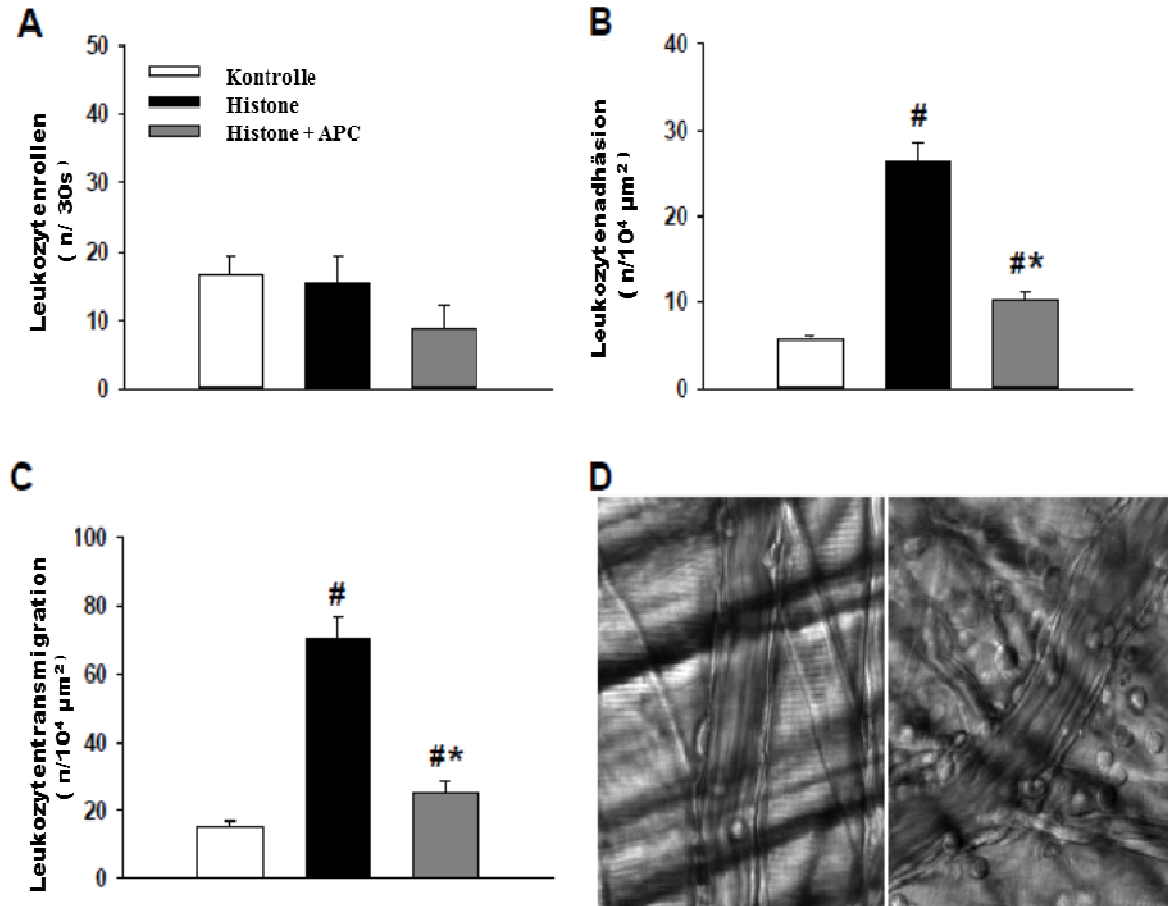


Abbildung 16: Gesteigerter Leukozytenrekretierung *in vivo* nach Histonstimulation

Die Intravitalmikroskopie wurde an postkapillären Venolen des Kremastermuskels durchgeführt. Jeweils sechs C57BL/6-Mäuse wurden durch intraskrotale Injektion mit Histonen, mit APC vorverdauten Histonen (Histone + APC) oder PBS (Kontrolle) behandelt.

Nach sechs Stunden erfolgte die Zählung von rollenden Leukozyten / 30 Sekunden (A), festen Adhäsionen (B) und transendothelialen Leukozytenmigrationen (C). Die Daten stellen jeweils Mittelwerte \pm SEM dar. # $p < 0.05$ vs. PBS-Kontrolle, * $p < 0.05$ vs. Histone.

D. Repräsentative Abbildungen veranschaulichen die Steigerung von Leukozytenadhäsion und Transmigration nach Injektion von Histonen (rechts) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach Injektion von PBS (links).

signifikant ($p < 0.05$) mehr FITC-Dextran in das Interstitium über als bei alleiniger Applikation von PBS. Auch hinsichtlich der transvaskulären Dextran-Permeabilität wurde die Wirkung der Histone durch die Vorinkubation mit APC signifikant ($p < 0.05$) reduziert. (Abbildung 17). Dies zeigt, dass extrazelluläre Histone *in vivo* zu einer lokalen Erhöhung der transendothelialen Permeabilität im Sinne einer Schrankenstörung führen, wobei die Vorinkubation mit APC protektiv wirkt.

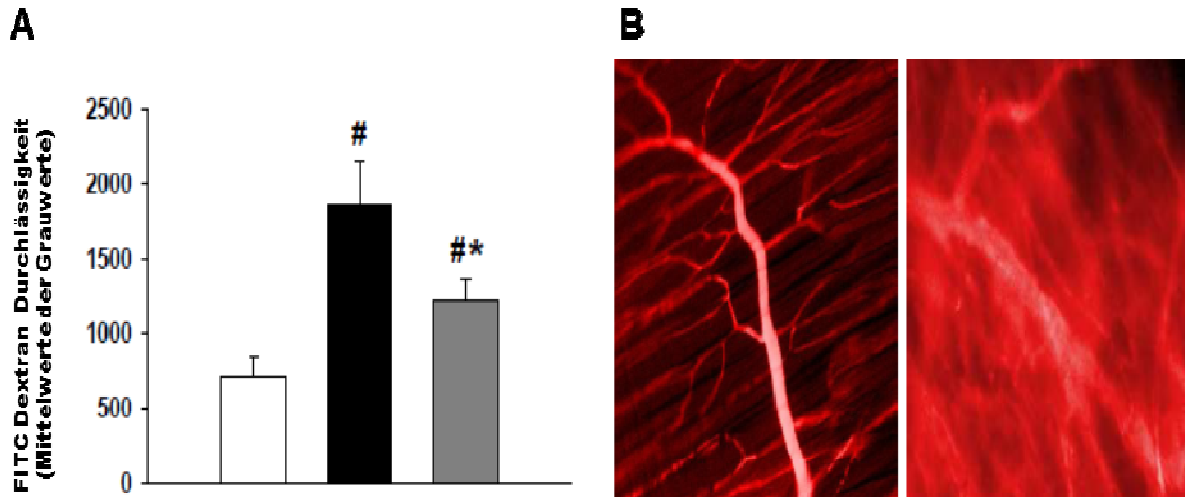


Abbildung 17: Erhöhte Permeabilität für FITC-Dextran in-vivo nach Histonstimulation

A. Messung der ins perivaskuläre Gewebe übergetretenen Menge des mit FITC markierten Dextrans durch intravitalmikroskopische Studien der postkapillären Venolen des Kremastermuskels männlicher C57BL/6-Mäuse sechs Stunden nach intraskrotaler Injektion von Histonen, mit APC vorverdauten Histonen (Histone + APC) oder PBS (Kontrolle). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert \pm SEM einer Gruppe von sechs Mäusen dar. # $p < 0.05$ vs. PBS-Kontrolle, * $p < 0.05$ vs. Histone.

B. Representative Darstellung der gesteigerten vaskulären Dextran Durchlässigkeit nach lokaler Injektion von Histonen (rechts) im Vergleich zu Kontroll-Gruppe nach Injektion mit PBS (links).

3.4 Extrazelluläre Histone steigern die Expression inflammatorischer Zytokine

Die Beteiligung extrazellulärer Histone bei der Organschädigung im Rahmen einer sterilen Inflammation wurde erstmals im Jahre 2009 für die Lunge (113) und 2011 für die Leber beschrieben (131). Da eine intravenöse Injektion von 75 mg/kg KG Histonen zu schweren mikrovaskulären Schäden der Lungen und zum sofortigen Exitus der Versuchstiere führt (50), wäre in einem solchen Versuch das Ausmaß einer Nierenschädigung nicht zu evaluieren. Um die systemische Wirkung der Histone herabzusetzen und einen akut letalen Effekt zu verhindern habe ich in meiner Arbeit die Histone in einer niedrigeren Konzentration (10 mg/kg KG) direkt in die linke Nierenarterie injiziert. Die Methode der Nierenarterien-perfusion zur lokalen Histonapplikation wurde freundlicherweise in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Bernd Hohenstein im Labor von Prof. Dr. Christian Hugo im Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der TU Dresden durchgeführt.

Tendenzieller Histon-induzierter Anstieg der Zytokinexpression ohne LPS-Stimulus

In ersten Versuchen zur Wirkung von extrazellulären Histonen auf die Niere *in vivo* wurden zuvor unbehandelte Mäuse verwendet und Proteinase K diente zur Histon-Vorverdauung. 24 Stunden nach Injektion von extrazellulären Histonen (10 mg/kg KG) in die linke Nierenarterie konnte mittels RT-PCR im Homogenat der ipsilateralen Niere im Vergleich zur kontralateralen Niere (Kontrolle) eine tendenziell erhöhte Expression der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, sowie der Zytokin-induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) nachgewiesen werden. Wurden die Histone vor der Injektion *in vitro* mit Proteinase K vorverdaut, so zeigte sich im Vergleich zur Applikation unbehandelter Histone eine tendenziell geringere Expression aller in der ipsilateralen Niere gemessenen Zytokine. Die Unterschiede der einzelnen Gruppen zeigten jedoch lediglich Trends und erreichten nicht das statistische Signifikanzniveau. Auffällig ist die große Streubreite der Werte in der Histon-Gruppe der ipsilateralen Niere (Abbildung 18).

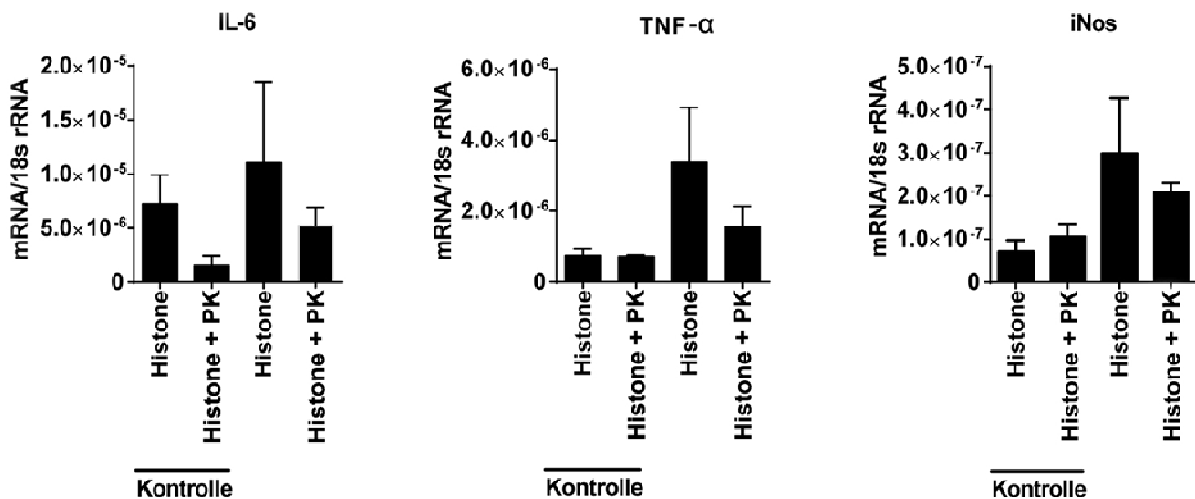


Abbildung 18: Renale Expression von IL-6, TNF- α und iNos nach lokaler Applikation von Histonen

Je fünf C45BL/6J Mäusen wurden Histone (10 mg/kg KG) oder mit Proteinase K vorverdaute Histone (10mg/kg KG) in die linke Arteria renalis injiziert. 24 h später erfolgte die Organentnahme beider Nieren, wobei die kontralaterale Niere als intraindividuelle Kontrolle diente. Messung der Expression von IL-6, TNF α und iNos in der homogenisierten Niere per quantitativer RT-PCR jeweils in Relation mRNA/18S rRNA. Die Daten stellen jeweils Mittelwerte von 5 Mäusen \pm SEM dar.

Akzentuierung des Histon-induzierten Anstiegs der Zytokinexpression durch LPS

Die beschriebenen Versuche bei zuvor unbehandelten Mäusen ergaben nach der Nierenarterienperfusion mit extrazellulären Histonen einen Trend, der einen Anstieg inflammatorischer Zytokine in der Niere vermuten ließ, jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 18). In intakten Zellen liegen Histone intrazellulär als Strukturproteine der DNA vor und sind epigenetisch wirksam. Erst nach vorangegangener Triggerung z.B. durch einen septischen Stimulus kommt es in Folge der allgemeinen Immunantwort zum Zelluntergang und somit zu der Freisetzung von Histonen in den Extrazellularraum, die zur Verstärkung der entzündlichen Reaktion und zur direkten Schädigung von Endothelzellen führen (114).

In meiner Arbeit habe ich diesen „septischen Stimulus“ durch die systemische Injektion von LPS simuliert, welches das Immunsystem für die folgende Applikation von extrazellulären Histonen sensitiviert und so die Entfaltung ihrer pro-entzündlichen Wirkung akzentuiert. Des Weiteren habe ich in der weiten Versuchsreihe nicht Proteinase K zur Vorverdauung der Histone verwendet, sondern entsprechend der Arbeit von Xu et al. (113) die Histone mit aktiviertem Protein C (APC) gespalten. 12 Stunden nach i.p. Gabe einer minimalen Dosis von LPS (1mg/kg KG) wurden physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle), unbehandelte Histone (10 mg/kg KG) oder durch APC vorverdaute Histone (10 mg/kg KG) in die linke Nierenarterie von Wildtyp C45BL/6J Mäusen injiziert. Beide Nieren wurden 24 Stunden später entnommen und mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zur nur mit LPS und Kochsalz behandelten Kontrollgruppe zeigte sich in den ipsilateralen Nieren, die mit unbehandelten Histonen perfundiert worden waren eine signifikant höhere Expression von Il-6, TNF- α und iNOS. Durch die Vorverdauung der Histone mit APC konnte dieser Effekt weitgehend aufgehoben werden: die Expression von Il-6, TNF- α und iNOS fiel danach wesentlich geringer aus als bei Behandlung mit intakten Histonen (Abbildung 19). Die Zytokinexpression der kontralateralen Nieren war in allen Gruppen nicht signifikant erhöht (Daten hierzu sind in der Abbildung nicht dargestellt). Im Gegensatz zu den oben genannten Vorversuchen ohne vorangegangene LPS-Triggerung waren die Unterschiede in allen genannten Gruppen statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$). Folglich lösen extrazelluläre Histone nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* die renale Produktion inflammatorischer Zytokine aus und wirken somit immunstimulierend.

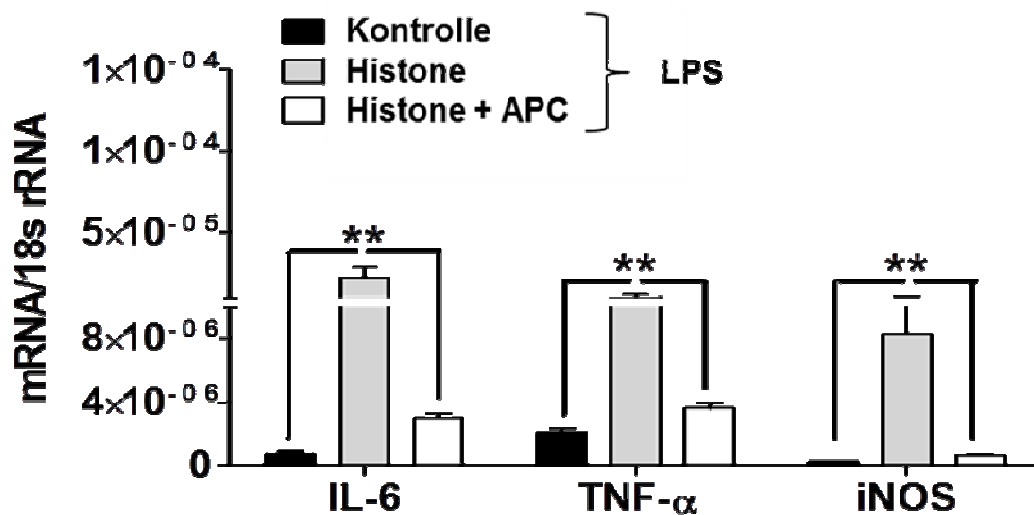


Abbildung 19: Renale Zytokinexpression nach Applikation von LPS (i.p.) und Histonen (lokal)

C45BL/6J Mäuse wurden mit 1 mg/kg KG LPS i.p. vorstimuliert. 12 Stunden später wurden 0,9%ige Kochsalzlösung (Kontrolle), unbehandelte Histone (10 mg/kg KG) oder mit APC vorverdaute Histone (10mg/kg KG) in die linke Arteria renalis injiziert. 24 Stunden später erfolgte die Entnahme der Nieren. Messung der mRNA- Spiegel von IL-6, TNF α , und iNos in der homogenisierten linken Niere per quantitativer RT-PCR jeweils in Relation mRNA/18S rRNA. Daten stellen Mittelwerte von 5-10 Mäusen \pm SEM, **p<0,01 gegenüber den Kontrollen dar.

3.5 Extrazelluläre Histone induzieren morphologische Nierenschäden

Extrazelluläre Histone induzieren mikrovaskuläre Nierenschädigungen

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden selbst kleinste mikrovaskuläre Nierenschädigungen bei 7500-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Hier zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit LPS ohne anschließende Histon-Injektion bereits zu Dilatation peritubulärer Kapillaren und zum interstitiellen Ödem führte. Die Applikation von Histonen verstärkte die beobachtete LPS-induzierte Vorschädigung und führte neben einer noch stärker ausgeprägten vaskulären Dilation und Ödembildung zusätzlich zur Kondensation von mikrovaskulärem Endothelzellchromatin, was dem Bild einer Apoptose entspricht. (Abbildung 20). Diese Aufnahmen wurden freundlicherweise von Professor Dr. Helen Liapis, Washington University, USA durchgeführt.

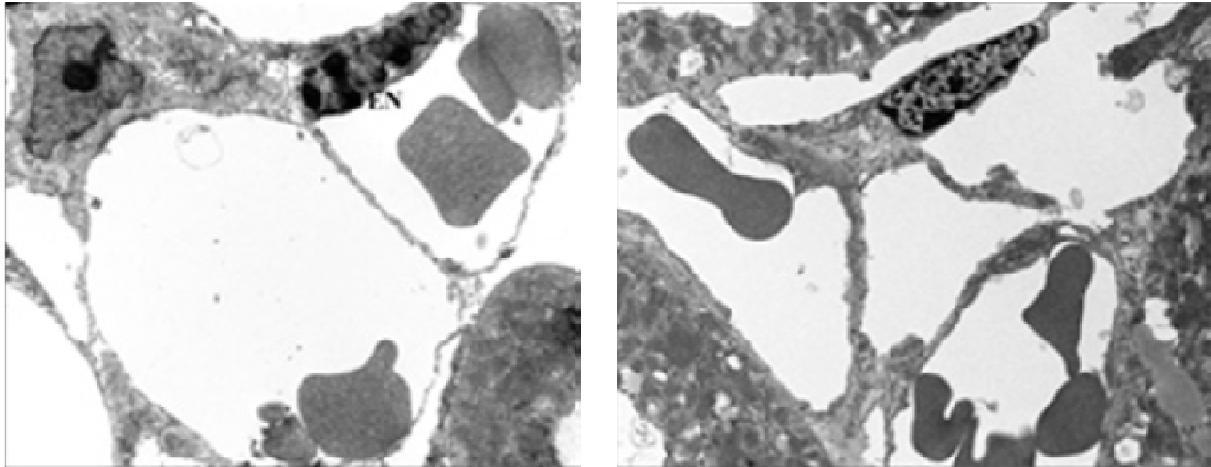


Abbildung 20: Mikrovaskuläre Schädigung der ipsilateralen Niere nach Perfusion mit Histonen

Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigen im Vergleich zur Kontrolle (links) verstärkte Dilatation peritubulärer Kapillaren, interstitielle Ödeme und vermehrt apoptotische Endothelzellen nach Perfusion der ipsilateralen Niere mit 10 mg/kg KG Histonen (rechts). Bildausschnitt ist 7500x vergrößert und repräsentativ für mindestens 5 Mäuse pro Gruppe.

Extrazelluläre Histone induzieren tubuläre Schädigungen

Die durch Histon-Injektion in die Arteria renalis induzierte morphologische Schädigung der Niere wurde mittels PAS-Färbung sichtbar gemacht und anhand des Tubulus Injury Scores (0-5) wie unter Methoden 2.2.10 „semi-quantitative Auswertung der Tubulusschäden“ beschrieben analysiert (Abbildung 21; C). Während in Nieren der Kontrollgruppe, denen Kochsalz (0,9%) statt Histone injiziert wurden, trotz gleicher LPS-Vorbehandlung mit 1mg/kg KG keine relevante tubuläre Schädigung nachgewiesen werden konnte (Tubular Injury Score von 0), zeigten sich in den mit Histonen (10 mg/kg KG) perfundierten Nieren mittelschwere bis schwere Schädigungen der Tubuli (Tubular Injury Score >3).

Extrazelluläre Histone induzieren renale Infiltration mit neutrophilen Granulozyten

Die renale Infiltration mit neutrophilen Granulozyten wurde als Ausdruck der Histon-induzierten entzündlichen Reaktion der Niere gewertet. Die bei 200-facher Vergrößerung durchgeführte quantitative Auswertung ergab in der Kontrollgruppe durchschnittlich 4 und in der Histon-Gruppe durchschnittlich 122 neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld (Abbildung 21; D).

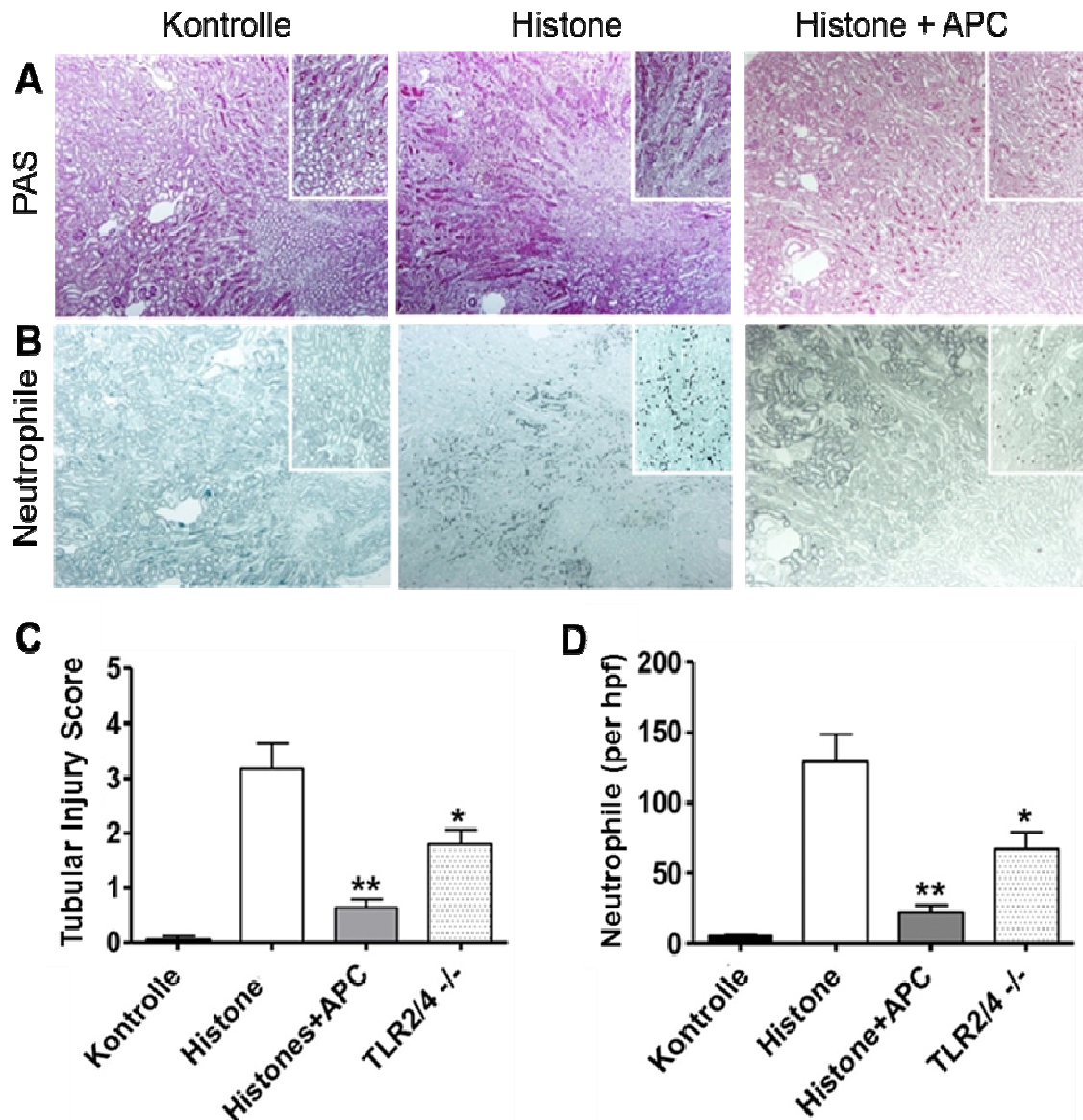


Abbildung 21: Morphologisches Korrelat der Nierenschädigung nach Perfusion mit Histonen

12 Stunden nach i.p. Injektion von 1 mg/kg KG LPS wurden Wildtyp C45BL/6J Mäusen entweder eine Kontrolllösung aus 0,9%iger NaCl oder Histone (10mg/kg KG) in die linke Nierenarterie injiziert.

A. Histologischer Schnitte durch die PAS-gefärbte linke Niere. Bildausschnitt ist 50x vergrößert und repräsentativ für mindestens 5 Mäuse pro Gruppe.

B. Histologische Schnitte durch die linke Niere wurden mit einer Färbung für neutrophile Granulozyten angefärbt. Bildausschnitt ist 50x vergrößert und repräsentativ für mindestens 5 Mäuse pro Gruppe.

C. Semiquantitative Analyse der tubulären Schädigung: Die einzelnen Nierenschnitte wurden mit Hilfe des Tubulus Injury Scores (0-5) bei einer 200-fachen Vergrößerung bewertet und zusammengefasst, wie in den Methoden unter 2.2.10 „semi-quantitative Auswertung der Tubulusschäden“ beschrieben.

D. Quantitative Bestimmung der neutrophilen Granulozyten: Die Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde wie unter 2.2.10 „quantitative Evaluation der Infiltration neutrophiler Granulozyten“ beschrieben pro Gesichtsfeld bei 200-fachen Vergrößerung gezählt.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte von 5 (Kontroll-Gruppe) bzw. 10 (Histon-Gruppe) Mäusen \pm SEM.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber Kontrollen.

3.5.1 Verminderte Nierenschädigung durch Histon-Inkubation mit APC

Die Applikation von APC wirkt bei LPS-induzierter akuter Nierenschädigung im Tiermodell nephroprotektiv, indem es die tubuläre Schädigung vermindert und sich positiv auf die Nierenfunktion auswirkt (132). Bei Gabe einer letalen Dosis von Histonen wird durch simultane Applikation von APC die Überlebensdauer von Mäusen verlängert (113). Es galt zu überprüfen, ob die Verabreichung von APC auch bei subletaler Histon-induzierter Nierenschädigung protektiv wirkt. Hierfür wurden extrazelluläre Histone vor der Nierenperfusion für eine Stunde *in vitro* mit 500 nM APC inkubiert. Während die Injektion von unbehandelten Histonen bei Wildtyp-Mäusen schwere tubuläre Schäden (Tubular injury Score >3) und eine renale Infiltration von neutrophilen Granulozyten (122/Gesichtsfeld) auslöste, verursachte die Applikation von Histonen, die mit APC vorverdaut worden waren signifikant geringere tubuläre Schäden (Tubular Injury Score <1) und eine signifikant geringere Neutrophileninfiltration (19/Gesichtsfeld). Durch Inkubation der Histone mit APC wurde somit die Histon-induzierte renale Wirkung vermindert (Abbildung 21).

3.5.2 Verminderte Histon-induzierte Nierenschädigung bei *Tlr2/4* Knockout-Mäusen

In meinen Experimenten wurde unter 3.2 *in vitro* nachgewiesen, dass die Histon-induzierte Produktion inflammatorischer Zytokine in renalen dendritischen Zellen von der Anwesenheit von TLR2 und TLR4 abhängig ist. Es galt zu überprüfen, ob *Tlr2/4* ^{-/-} Mäuse vor einer Histon-induzierten Nierenschädigung *in vivo* geschützt sind. Analog der C45BL/6J Wildtyp-Gruppe wurden den *Tlr2/4* Knockout-Mäusen 12 Stunden nach i.p. Gabe einer minimalen Dosis von LPS (1mg/kg KG) unbehandelte Histone (10 mg/kg KG) in die linke Nierenarterie injiziert und nach 24 Stunden die Nieren entnommen. Die histologische Auswertung der Nieren der *Tlr2/4* Knockout-Mäuse ergab einen signifikant geringeren Tubular Injury Score (<2) und eine niedrigere Anzahl neutrophiler Granulozyten (<60/Gesichtsfeld) als bei Wildtyp-Mäusen, die die gleiche Dosis unbehandelter Histone erhalten hatten (Abbildung 21; C-D). Der schädigende Effekt von Histonen war in den Knockout-Mäusen nicht vollständig aufgehoben und stärker ausgeprägt als in den mit APC behandelte Wildtyp-Mäusen, was weitere TLR-unabhängige Mechanismen vermuten lässt.

3.6 Protektiver Effekt von anti-Histon IgG bei LPS-induzierter Nierenschädigung

Um die spezifische Rolle extrazellulärer Histone als Mediatoren des septischen Nierenversagens zu untersuchen wurde entsprechend etablierten Mausmodellen Endotoxin-induziertes Nierenversagen durch eine intraperitoneale Gabe von LPS (10 mg/kg KG) hervorgerufen (26, 133, 134). Zur Nephroprotektion wurde den Mäusen zwei Stunden vor der LPS-Injektion anti-Histon IgG (20 mg/kg KG) oder Kontroll-IgG (20 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. Dabei wurden die gleichen Histon-Antikörper verwendet wie in der vorangegangenen Publikation von Xu et. al. in der erstmals der Zusammenhang von extrazellulären Histonen und Sepsis postuliert wurde (113).

3.6.1 Reduzierte morphologische Nierenschädigung durch anti-Histon IgG

Zwölf Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion (10 mg/kg KG) wurden die Mäuse beider Versuchsgruppen getötet und beide Nieren entnommen um histologische Schnitte mit einer PAS- und einer Neutrophilenfärbung anzufertigen. Die Auswertung der PAS-gefärbten Schnitte der Nieren von Mäusen, die vor der LPS Gabe lediglich mit Kontroll-IgG behandelt worden waren, ergab unter Verwendung des Tubular Injury Scores Werte von 2 bis 3, was einer mittel- bis schwergradigen tubulären Schädigung entspricht. Nieren der Mäuse, denen anti-Histon IgG injiziert worden war, wiesen dahingegen lediglich tubuläre Schäden des Schweregrades 1 bis 2 auf (Abbildung 22; B). Dies zeigt eine Reduktion des durch Endotoxin induzierten morphologischen Nierenschadens durch die präventive Verwendung von anti-Histon IgG. Zusätzlich wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung bestimmt und als Indikator der immunologischen Entzündungsreaktion herangezogen. Während in den Nierenschnitten der Kontroll-Gruppe durchschnittlich 40 neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld gezählt wurden, ergab die quantitative Auswertung der mit anti-Histon H4 behandelten Mäuse eine durchschnittliche Neutrophilenzahl von 25 pro Gesichtsfeld (Abbildung 22; C). Sowohl hinsichtlich der tubulären Schädigung, als auch der renalen Neutrophileninfiltration war der Unterschied zwischen den mit anti-Histon IgG und Kontroll-IgG behandelten Mäusen hoch signifikant (** $p < 0,01$).

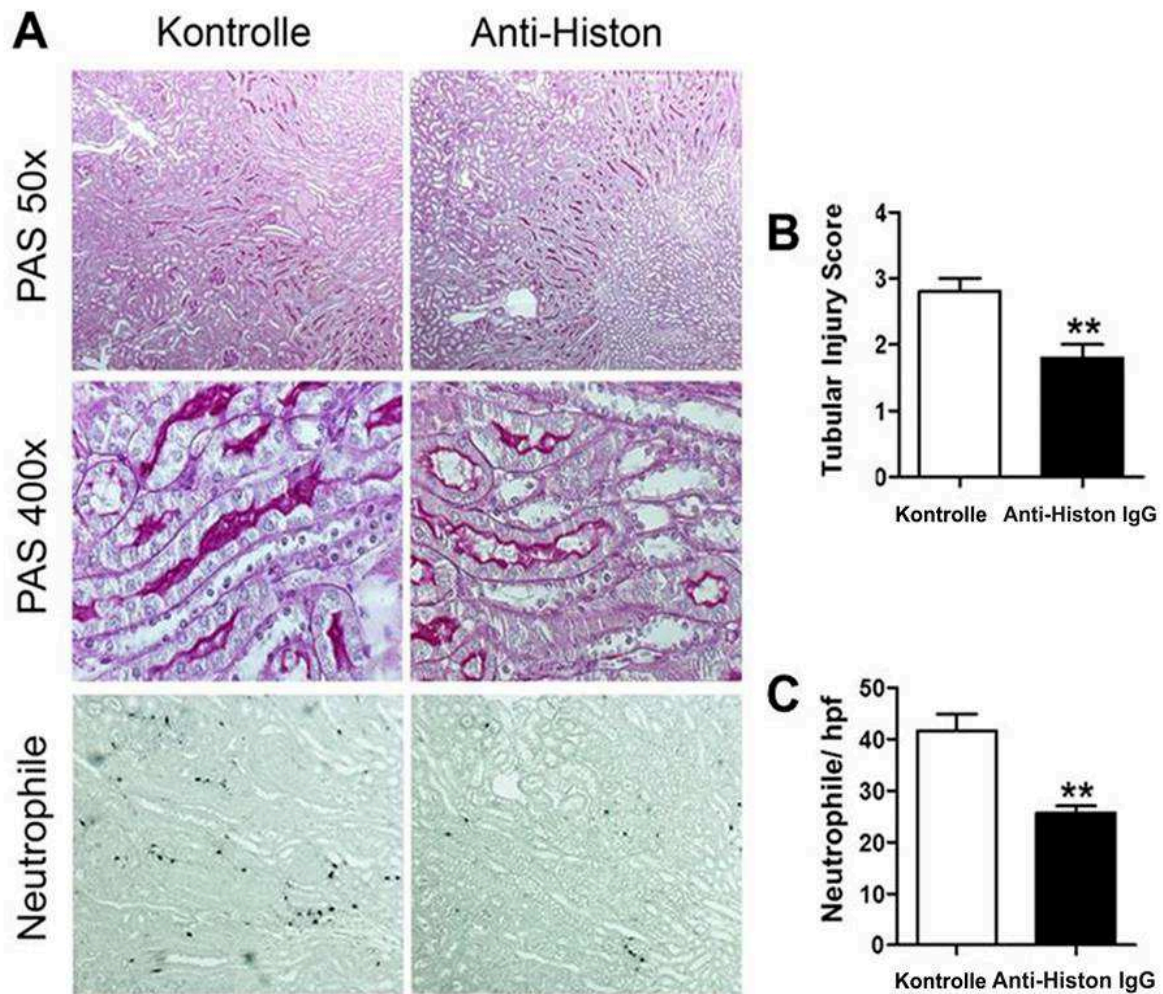


Abbildung 22: Behandlung mit anti-Histon IgG schützt vor LPS-induzierter Nierenschädigung

2 Stunden nach i.p. Injektion von jeweils 20 mg/kg KG anti-Histon IgG oder Kontroll-IgG wurde septisches Nierenversagen durch LPS (10 mg/kg KG) induziert. 12 Stunden nach LPS-Injektion erfolgte die Blut- und Nierenentnahme.

A. Nierenschnitte wurden mit PAS und einer spezifischen Färbung für neutrophile Granulozyten angefärbt. Bildausschnitte sind um 50x, 100x, 400x vergrößert und repräsentativ für mindestens 6 Mäuse pro Gruppe.

B. Semiquantitative Analyse der tubulären Schädigung: Die einzelnen Nierenschnitte wurden mit Hilfe des Tubulus Injury Scores (0-5) bei einer 200-fachen Vergrößerung bewertet und zusammengefasst

C. Quantitative Bestimmung der neutrophilen Granulozyten: Die Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung gezählt wie in den Methoden unter 2.2.10 beschrieben.

Die oben genannten Daten stellen jeweils Mittelwerte von 6 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $<0,001$ gegenüber Kontrollen ohne anti-Histon Behandlung

3.6.2 Schutz vor Funktionsverlust der Niere durch anti-Histon IgG

Als Parameter der funktionellen Nierenschädigung wurde den Mäusen zwölf Stunden nach der Injektion von LPS (10 mg/kg KG) Blut entnommen und es wurden die Serum-Kreatininwerte bestimmt. Bei Mäusen der Kontroll-Gruppe ohne anti-Histon-Behandlung wurden erhöhte Serum-Kreatininwerte um 0,6 mg/dl gemessen, wohingegen der Serum-Kreatininspiegel der mit anti-Histon IgG injizierten Mäuse um 0,3 mg/dl schwankte (Abbildung 23). Daraus ist zu schließen, dass die präventive Gabe neutralisierender Histon-Antikörper vor renalem Funktionsverlust in Folge einer septischen Nierenschädigung schützt. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass bei Verwendung von anti-Histon IgG im Vergleich zu Kontroll-IgG der LPS-induzierte Nierenschaden sowohl strukturell, als auch funktionell deutlich abgeschwächt wurde.

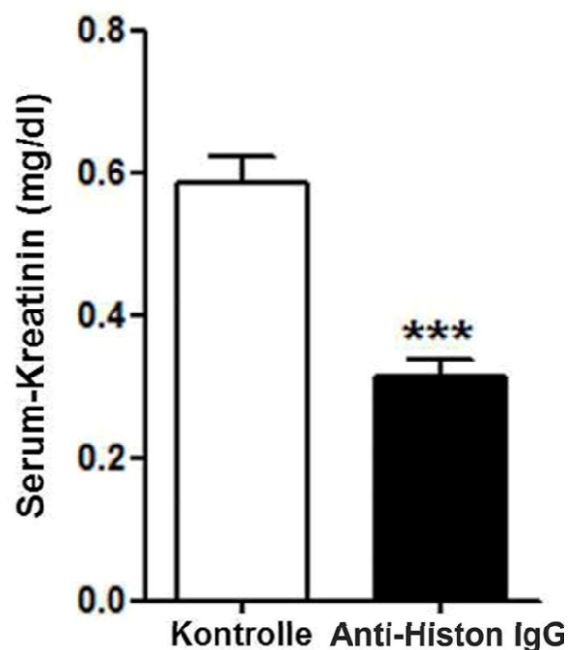


Abbildung 23: Kreatininkonzentration im Serum nach LPS-induzierter Nierenschädigung

2 Stunden nach i.p. Injektion von jeweils 20 mg/kg KG anti-Histon IgG oder Kontroll-IgG wurde septisches Nierenversagen durch LPS (10 mg/kg KG) simuliert. 12 Stunden nach der LPS-Injektion erfolgte die Blutentnahme. Die Kreatininkonzentration im Serum (mg/dl) wurde wie in (Methoden XX) bestimmt. Die genannten Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von mindestens 6 Mäusen jeder Gruppe dar; ***<0,001 gegenüber Kontroll-IgG-Gruppe.

3.7 Protektiver Effekt von anti-Histon IgG bei ischämischer Nierenschädigung

Um zu belegen, dass die Neutralisation von Histonen ebenfalls zu einem milderen Verlauf des ischämischen Nierenversagen beiträgt, wurden Wildtyp-Mäusen für 30 Minuten beide Nierenarterien abgeklemmt und direkt im Anschluss i.p. anti-Histon IgG (20mg/kg KG) oder Kontroll-IgG injiziert. 24 später erfolgte die Nierenentnahme zur histologischen Beurteilung des Ischämie/Reperfusionsschädigung.

3.7.1 Reduzierte morphologische Nierenschädigung durch anti-Histon IgG

Zur semiquantitativen Beurteilung der tubulären Schädigung wurde anhand des Vorkommens von Tubuluszellnekrosen, Bürstensaumverlust, Tubulusdilatationen und luminale Zylinderformationen der „Tubular Injury Score“ (0-5) ermittelt. Bei mit anti-Histon IgG behandelten Mäusen war die morphologische Nierenschädigung mit einem durchschnittlichen „Tubular Injury Score“ von 1,5 meist als milde einzustufen, während Nierenschäden der Kontroll-Gruppe mit einem Score >3 überwiegend als schwer zu bewerten waren. Dies belegt einen hoch signifikanten (***) Unterschied der postischämischen tubulären Schädigung von anti-Histon-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abbildung 24; B). Als Indikator der immunologischen Entzündungsreaktion wurde mittels manueller Zählung die Anzahl renal infiltrierender neutrophiler Granulozyten bei 200-facher Vergrößerung bestimmt. Während in den Nierenschnitten der Kontroll-Gruppe durchschnittlich 63 neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld gezählt wurden, ergab die quantitative Auswertung der mit anti-Histon IgG behandelten Mäuse eine durchschnittliche Neutrophilenzahl von 22 pro Gesichtsfeld und fiel damit signifikant (** p < 0.01) geringer aus (Abbildung 24; C). Auch die Anzahl TUNEL-positiver renaler Zellen als Indikator für postischämischen Zelltod ergab unter Verwendung von anti-Histon IgG signifikant (** p < 0.01) geringere Werte, als in der Kontroll-Gruppe (Abbildung 24; D). Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten morphologisch nachgewiesen werden, dass die Applikation von anti-Histon IgG postischämische tubuläre Schädigungen und Apoptose, sowie die Infiltration neutrophiler Granulozyten signifikant vermindert und nephroprotektiv wirkt.

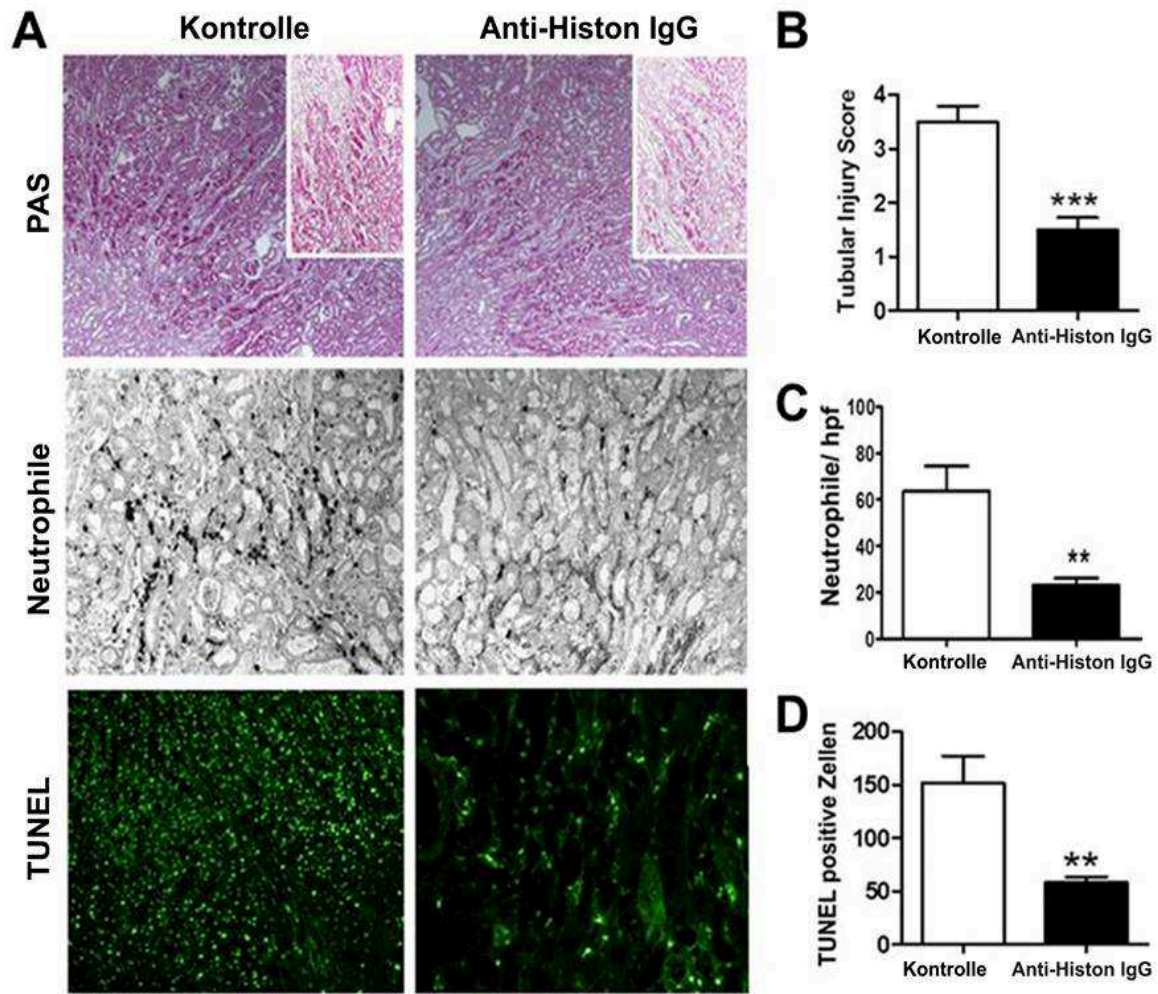


Abbildung 24: Behandlung mit anti-Histon IgG schützt vor postischämischer Nierenschädigung

Nach 30 minütiger bilateraler Abklemmung der Nierenarterien wurde C45BL/6J Mäusen umgehend anti-Histon IgG (20mg/kg KG) injiziert. 24 Stunden später erfolgte die Nierenentnahme.

A. Nierenschnitte wurden jeweils mit PAS-, TUNEL- und Neutrophilenfärbungen behandelt. Die Bildausschnitte sind 400x vergrößert und repräsentativ für mindestens 6 Mäuse pro Gruppe.

B. Semiquantitative Analyse der tubulären Schädigung: Die einzelnen Nierenschnitte wurden mit Hilfe des Tubulus Injury Scores (0-5) bei einer 200x Vergrößerung bewertet und zusammengefasst, wie in den Methoden unter 2.2.10 beschrieben.

C. Quantitative Bestimmung der neutrophilen Granulozyten: Die Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde pro Gesichtsfeld bei 200x Vergrößerung gezählt wie in den Methoden unter 2.2.10 beschrieben.

D. Quantitative Bestimmung TUNEL-positiver Zellen: Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde pro Gesichtsfeld bei 200x Vergrößerung gezählt wie in den Methoden unter 2.2.10 beschrieben.

Die oben genannten Daten stellen jeweils Mittelwerte \pm SEM von mindestens 6 Mäusen pro Gruppe dar.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $<0,001$ gegenüber Kontrollen ohne anti-Histon Behandlung.

3.7.2 Reduzierte Expression inflammatorischer Zytokine durch anti-Histon IgG

In jüngster Vergangenheit wurde mehrfach über die pro-entzündliche Wirkung von extrazellulärem Chromatin berichtet (113, 135, 136). Durch die bereits beschriebenen Versuche meiner Arbeit wurde nachgewiesen, dass extrazelluläre Histone neben einer direkten Zellschädigung auch Zytokin-vermittelte Effekte auf die Niere ausüben. Es galt nun zu überprüfen ob die Gabe von anti-Histon IgG bei postischämischer Nierenschädigung protektiv hinsichtlich dieses pro-inflammatorischen Effekts wirkt. Hierfür wurde bei C45BL/6J Wildtyp-Mäusen, denen entweder anti-Histon IgG (20mg/kg KG) oder Kontroll-IgG verabreicht worden war 24 Stunden nach bilateraler Nierenarterienabklemmung beide Nieren entnommen und mittels RT-PCR-Analysen die intrarenale mRNA Expression von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-12 und TNF- α) und Chemokinen (CXCL2, CXCL10, CCL5) ermittelt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1), einem Indikator der renalen Schädigung, und die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 bestimmt. KIM-1 wird als früher Marker der akuten Nierenschädigung verwendet und wird vorwiegend auf Epithelzellen des proximalen Tubulus exprimiert (137). Es ist bekannt, dass die Expression von KIM-1 insbesondere in Folge einer postischämischen Nierenschädigung in renalen Zellen hochreguliert wird (138). In meinen Experimenten erreichte der Unterschied zwischen Mäusen, die mit anti-Histon IgG behandelt wurden und denen, welche Kontroll-IgG erhielten nach postischämischer Schädigung nicht das Signifikanzniveau, aber zeigte mit p-Wert von 0,06 einen deutlichen Trend (Abbildung 25). Es zeigte sich eine signifikant geringere Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12 in Nieren von anti-Histon-behandelten Mäusen im Vergleich zu denen der Kontroll-Gruppe. Auch die renalen mRNA Level der Chemokine CXCL2 und CCL5, sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 fielen im Vergleich zur Kontrolle bei Gabe von anti-Histon IgG signifikant geringer aus (Abbildung 25). Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass die Neutralisation von Histonen durch anti-Histon IgG bei postischämischer Nierenschädigung zu einer verminderten Induktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, einer Abmilderung der renalen Infiltration von neutrophilen Granulozyten, weniger Apoptose und einer mildereren tubulären Schädigung führt.

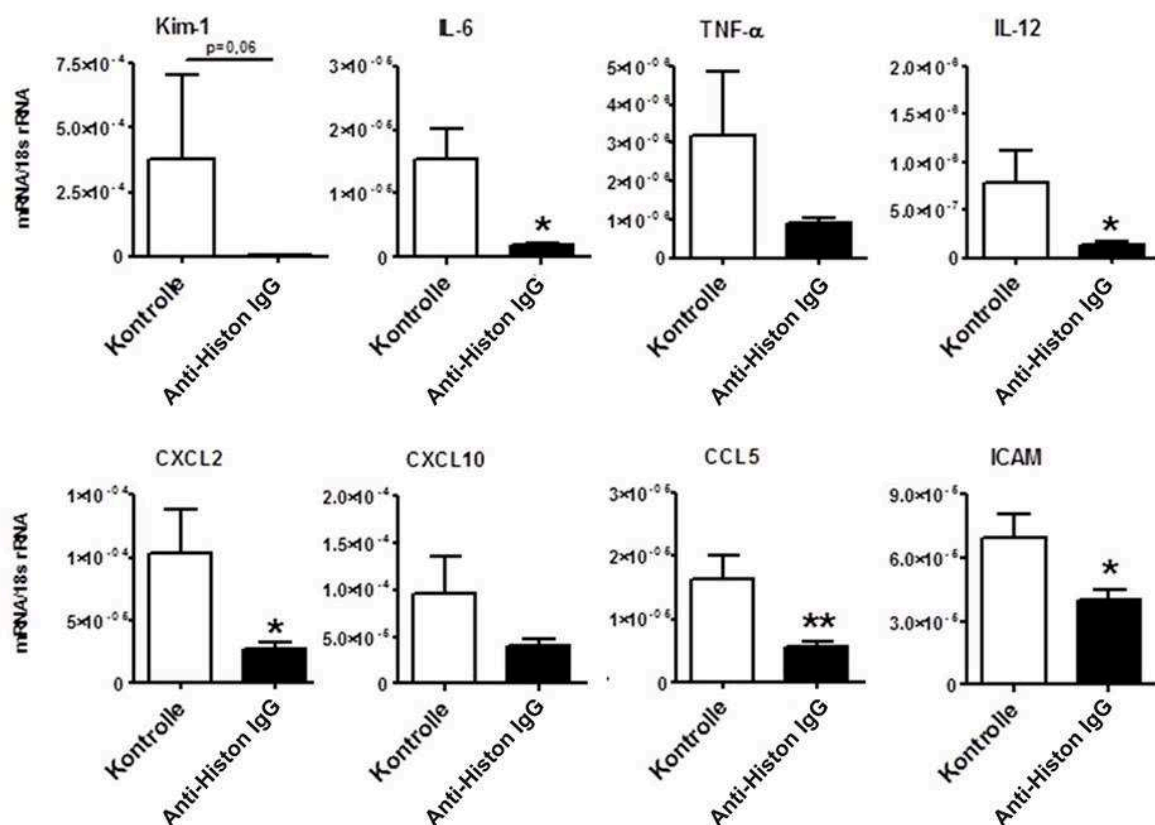


Abbildung 25: Abgeschwächte Expression inflammatorischer Zytokine durch anti-Histon IgG bei ischämischer Nierenschädigung

Nach 30-minütiger bilateraler Abklemmung der Nierenarterien wurde C45BL/6J Mäusen umgehend anti-Histon IgG injiziert. 24 Stunden später erfolgte die Nierenentnahme.

Messung der Expression von KIM-1, ICAM und verschiedenen Zytokinen per quantitativer RT-PCR jeweils in Relation mRNA/18S rRNA. Daten stellen Mittelwerte von 6 Mäusen ± SEM dar, *p<0,05 ** p < 0.01 gegenüber Kontrollen ohne anti-Histon Behandlung.

4 Diskussion

4 Diskussion

Intrazelluläre Histone sind Strukturproteine der DNA und beeinflussen als epigenetische Komponente die Gentranskription. Dahingegen üben Histone, die im Rahmen einer Zellschädigung in den extrazellulären Raum freigesetzt werden toxische und pro-entzündliche Effekte aus (114). Daher hatte ich die Hypothese aufgestellt, dass Histone, die aus geschädigten renalen Zellen freigesetzt werden, als „Gefahrensignale“ fungieren und über Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems eine sterile Entzündung induzieren. In der vorliegenden Arbeit wird mit verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt, dass extrazelluläre Histone zytotoxisch auf renale Zellen wirken und über TLR2- und TLR4- abhängige Mechanismen die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine stimulieren, was zur Eskalation der akuten Nierenschädigung beiträgt. Dieses Konzept wurde in meiner Arbeit auch dadurch bestätigt, dass die Gabe von anti-Histon Immunglobulin G (IgG) im Mausmodell der LPS-induzierten und ischämisch-induzierten Nierenschädigung einen nephroprotektiven Effekt ausübte.

Eine akute Tubulusnekrose beinhaltet die Freisetzung intrazellulärer Moleküle wie HMGB1 in den extrazellulären Raum (139, 140). HMGB1 ist ein nukleärer Faktor, der als inflammatorisches Zytokin in den Extrazellularraum freigesetzt wird und einen endogenen Liganden für TLR4 darstellt (141). Khader Rupanagudi aus unserer Arbeitsgruppe hat in *in-vitro*-Studien nachgewiesen, dass Histone ähnlich wie HMGB1 von sterbenden tubulären Zellen freigesetzt werden (115). In meinen hier vorgelegten *in-vitro*-Experimenten konnte ich nun mittels Proliferationsassays belegen, dass extrazelluläre Histone einen dosisabhängigen toxischen Effekt auf glomeruläre Endothelzellen und auf tubuläre Epithelzellen ausüben.

Sowohl TLR2 als auch TLR4 werden auf intrarenalen Immunzellen und auf renalen Parenchymzellen exprimiert und wirken als Mediatoren einer sterilen Entzündung. (88, 91, 96, 142). Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt dass die Deletion von *Tlr2* oder *Tlr4* im Knockout-Modell der Maus ausreicht um das Ausmaß einer akuten Nierenschädigung signifikant zu reduzieren (91, 96). In vorausgegangenen *in-vitro*-Studien unserer Arbeitsgruppe wurde anhand von Histon-TLR2/TLR4 -Bindungsassays belegt, dass Histone Liganden für TLR2- und TLR4-Rezeptoren sind (115). In der hier vorgelegten Arbeit wurden renale dendritische Zellen aus Wildtyp- oder *Tlr2/4* doppelt defizienten Knockout-Mäusen

isoliert, diese mit ansteigenden Histon-Dosen stimuliert und im Anschluss wurde mittels ELISA die Konzentration von IL-6 im Überstand bestimmt. Dabei konnte ich nachweisen, dass Histone bei Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch bei *Tlr2/4* doppelt defizienten Knockout-Mäusen zu einer dosisabhängigen Produktion von IL-6 führen. Hierdurch konnte ich auch belegen, dass extrazelluläre Histone über TLR2 und TLR4 die Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins IL-6 in renalen dendritischen Zellen stimulieren.

Die Rolle extrazellulärer Histone als Mediatoren der Sepsis und Sepsis-assoziiierter Organläsionen wurde bereits am Beispiel des Lungen- und Leberversagens im Mausmodell beschrieben (113, 131). Xu und Kollegen injizierten Mäusen intravenös Histone in einer Dosis von 75 mg/kg KG und verursachten damit eine schwere akute mikrovaskuläre Schädigung der Lunge, die innerhalb weniger Minuten tödlich verlief (113). Die Autoren verwendeten dann eine subletale Histon-Dosis von 25 mg/kg KG i.v. und fanden zwei Stunden danach einen Anstieg von TNF- α und IL-6 im Plasma. Sie konnten damit nicht nur einen direkten toxischen Effekt, sondern auch die pro-inflammatorische Wirkung von extrazellulären Histonen belegen (131). In meiner Arbeit wurde daher eine nicht letale Dosis von extrazellulären Histonen (10 mg/kg KG) direkt in die linke Nierenarterie appliziert, um eine systemische Beteiligung der Histon-Wirkung zu minimieren, so dass der lokale Effekt auf die linke Niere untersucht werden konnte. In dem hier gewählten Versuchsansatz kann eine Einschränkung der Nierenfunktion nicht anhand eines Anstiegs der Kreatininkonzentration im Serum bemessen werden, weil die kontralaterale Niere weitgehend intakt bleibt. Allerdings ist ein gewisser systemischer Effekt der Histone und damit eine leichte schädigende Wirkung auf die kontralaterale Niere nicht auszuschließen. Meine Vorversuche zur Wirkung von extrazellulären Histonen auf die Niere ergaben zunächst keine signifikanten Unterschiede der Zytokinexpression und der morphologisch nachweisbaren Nierenläsion zwischen der Histon-perfundierten und der kontralateralen Kontroll-Nieren. Wolfs und Kollegen hatten bereits gezeigt, dass die Expression von *Tlr2* und *Tlr4* in tubulären Epithelzellen der Niere während einer Entzündungsreaktion hochreguliert wird (89). Dieser Mechanismus wird durch einen initialen Stimulus wie LPS ausgelöst (142). In meiner Arbeit habe ich daher den Mäusen zunächst systemisch eine niedrige Dosis von LPS (1mg/kg KG) verabreicht, die per se nicht zu einer signifikanten Nierenschädigung führt (133). Die daraufhin erfolgte Nierenarterienperfusion mit extrazellulären Histonen in der gleichen

Konzentration wie in den oben genannten Vorversuchen führte nun zu einer hoch signifikanten Steigerung der renalen Expression von inflammatorischen Zytokinen und zu morphologischen Veränderungen in Form von Tubulusnekrosen und einer renalen Infiltration neutrophiler Granulozyten. Daraus kann geschlossen werden, dass entzündliche Stimuli wie LPS die Niere für die schädigende Wirkung von extrazellulären Histonen empfänglich machen. In weiterführenden Experimenten habe ich *Tlr2/4* doppelt-defiziente Knockout-Mäuse ebenfalls mit systemischer LPS-Applikation vorstimuliert und im Anschluss die Nierenarterien mit Histonen perfundiert. Danach fielen der Zytokinanstieg und die Nierenschädigung deutlich geringer aus. Dies unterstreicht die Rolle von TLR2 und TLR4 bei der Vermittlung pro-inflammatorischer Effekte von extrazellulären Histonen.

Die nephrotoxischen und pro-entzündlichen Effekte von extrazellulären Histonen im Nierenarterienperfusions-Modell der Maus habe ich zusätzlich durch verschiedene experimentelle Ansätze der Histon-Inaktivierung untersucht. Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits die Wirkung von Histonen (30 mg/ml) auf dendritische Zellen aus murinem Knochenmark erforscht und in ELISA-Untersuchungen einen Anstieg von TNF- α und IL-6 nach Histon-Stimulation nachgewiesen, welcher durch Präinkubation mit Proteinase K eliminiert wurde (115). In meinen eigenen Experimenten habe ich in Vorversuchen die Auswirkung einer Präinkubation von Histonen mit Proteinase K *in vivo* untersucht, wobei sich ein Trend zur Hemmung des Histon-Effekts, jedoch kein signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollen ergab. Die fehlende statistische Signifikanz des Resultats ist möglicherweise auf einen zu geringen Effekt, eine zu geringe Zahl der Versuchsansätze und/oder eine zu hohe Varianz der einzelnen Schritte des Versuchsansatzes zurückzuführen. Dieser Ansatz wurde daher in meiner vorgelegten Arbeit nicht mehr als Modell für die Inaktivierung der Histone weiterverfolgt.

Als zweite experimentelle Strategie habe ich Histone mit aktivierten Protein C (APC) präinkubiert bevor sie *in-vivo* über eine unilaterale Nierenarterienperfusion appliziert wurden. Hierbei zeigte sich mittels PCR-Analysen eine signifikant reduzierte Expression von IL-6 und TNF- α , sowie morphologisch eine signifikant geringere Anzahl renal infiltrierender neutrophiler Granulozyten und ein geringeres Ausmaß an tubulären Schädigungen. Diese Daten der Histon-Inaktivierung mit APC untermauern den pro-inflammatorischen Effekt von Histonen.

Im Ablauf der Entzündung kommt es zu einer Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut an den Ort der Läsion, wobei es zunächst zum Rollen und dann zur Adhäsion der Leukozyten an das Endothel kommt. Dabei wird die Expression der β 2-Integrine stimuliert, was letztlich die Transmigration der Leukozyten bewirkt (143, 144). In meinen Experimenten konnte anhand der Intravitalmikroskopie der postkapillären Venolen des Kremastermuskels belegt werden, dass die intraskrotale Injektion von Histonen zu einer signifikanten Verstärkung der Leukozytenadhäsion und -transmigration führt und die mikrovaskuläre Permeabilität erhöht. Dagegen wurde das Rolling der Leukozyten durch Histone nicht beeinflusst. Die nicht signifikante Beeinflussung des Leukozytenrollens bei gleichzeitig gesteigerter Leukozytenadhäsion und -transmigration wurde im LPS-Modell der Maus bereits von Frommhold und Kollegen beschrieben (145).

In vitro Studien hatten bereits gezeigt, dass die Leukozytenrekrutierung an den Ort der Entzündung durch APC gehemmt werden kann (146, 147). Die Gruppe von Frommhold und Kollegen (145) hat in Tierversuchen auch belegt, dass nach intraskrotaler Verabreichung einer subletalen Dosis von LPS durch eine gleichzeitige Gabe von APC die Leukozytenrekrutierung im Bereich des Kremastermuskels gehemmt wird, wobei eine multifaktorielle Ursache für diesen protektiven Effekt angenommen wurde. In meinen Experimenten konnte der pro-inflammatorische Effekt extrazellulärer Histone auf die Leukozytenrekrutierung durch die Vorbehandlung der Histone mit APC signifikant reduziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass das proteolytisch wirksame APC zu einer strukturellen Veränderung der Histone führt und damit die Histon-Wirkung abschwächt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die protektive Wirkung von APC zum Teil auch durch einen zusätzlichen von der Histonen-Proteolyse unabhängigen Effekt herbeigeführt wird und zum Beispiel auf einer anti-thrombotischen (148), pro-fibrinolytischen (149) oder anti-apoptotischen (150) Wirkung von APC beruht.

Meine bisher gewonnenen Daten wiesen bereits darauf hin, dass extrazelluläre Histone für die Verstärkung einer Nierenschädigung eine wichtige Rolle spielen. Als Maus-Modelle der akuten Nierenschädigung sind unter anderem die experimentelle Ischämie/Reperfusionsschädigung der Niere und die LPS-induzierte systemische Entzündung mit konsekutivem Nierenversagen etabliert. In den genannten Modellen liegen bereits umfangreiche Daten zum Verlauf beziehungsweise der Dosis-Wirkungsbeziehung vor (17, 26,

90, 133). Um die Hypothese meiner Dissertationsarbeit zu untermauern und die Beteiligung extrazellulärer Histone bei der Exazerbation einer ischämischen und Endotoxin-induzierten akuten Nierenschädigung zu belegen, habe ich in beiden oben genannten Maus-Modellen Histon-Neutralisationsversuche zur potentiellen Nephroprotektion durchgeführt.

Wu und Wang haben in überzeugenden Tierversuchen den protektiven Effekt von HMBG1-blockierenden Antikörpern beim Ischämie/Reperfusionsschaden der Maus nachgewiesen (151). Nach diesem Prinzip sind auch neutralisierende anti-Histon Antikörper verwendet worden, um den pro-entzündlichen Effekt von Histonen zu blockieren und so vor einer tödlichen Endotoxinämie oder einer toxischen Leberschädigung zu schützen (113, 131). In meinen Untersuchungen habe ich denselben Ansatz auf die experimentell induzierte Nierenschädigung übertragen. Hierbei habe ich zwei Stunden vor der Induktion einer LPS-induzierten oder ischämischen Nierenschädigung je 20 mg/kg KG anti-Histon IgG oder Kontroll-IgG intraperitoneal verabreicht. Nach 12 Stunden zeigten sich in Mäusen, die mit anti-Histon IgG vorbehandelt worden waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringerer Anstieg der Serum-Kreatininwerte, eine signifikant geringere tubuläre Schädigung und signifikant weniger infiltrierende neutrophile Granulozyten. Dies belegt die nephroprotektive Wirkung von anti-Histon IgG und unterstützt im Umkehrschluss die Hypothese, dass Histone als Mediatoren das Ausmaß der akuten Nierenschädigung maßgeblich beeinflussen.

In weiterführenden Studien unserer Arbeitsgruppe mit dem Ischämie/Reperfusionsmodell zeigte sich, dass durch eine Neutralisation der Histone mit anti-Histon IgG insbesondere ein protektiver Effekt auf Tamm-Horsfall-Protein-positive Zellen entsprechend des distalen Tubulus nachweisbar war, während Lectin-positive Zellen des proximalen Tubulus nicht signifikant beeinflusst wurden (115). Analog zu diesen Daten stellte ich in meinen eigenen Experimenten fest, dass die Expression von KIM-1, einem Biomarker der renalen Schädigung im proximalen Tubulus (137), durch die Gabe von anti-Histon IgG im Mausmodell der ischämischen Nierenschädigung nicht signifikant gesenkt wurde. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass in der postischämischen Niere insbesondere in Epithelzellen des distalen Tubulus *Tlr2* und *Tlr4* hochreguliert werden (89).

Die Ergebnisse der vorgelegten *in vivo* – Untersuchungen belegen, dass extrazelluläre Histone zur Endotoxin-induzierten und postischämischen Entzündung der Niere und der

dadurch bedingten akuten Nierenschädigung beitragen. Dies wurde in meinen Untersuchungen durch die intrarenale Zytokinexpression, die Induktion von KIM-1, eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, den Nachweis von Tubulusnekrosen und einen Anstieg des Serum-Kreatininspiegels belegt.

Beim Zelluntergang neutrophiler Granulozyten werden u.a. Histone freigesetzt, welche zur Bildung von NETs beitragen und aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung ein zusätzliches Effektorelement der Wirtsantwort darstellen (71). Es ist wahrscheinlich, dass neutrophile Granulozyten, die in die ischämisch oder toxisch geschädigte Niere infiltrieren ebenfalls Histone freisetzen und somit den Entzündungsprozess verstärken. Die Bedeutung der von Neutrophilen freigesetzten NETs ist bereits bei der renalen Vaskulitis und Lupusnephritis belegt worden (136, 152) und konnte nun durch unsere Arbeitsgruppe auch für die nekrotisierende Glomerulonephritis nachgewiesen werden (153).

Meine hier vorgelegten Untersuchungen identifizierten extrazelluläre Histone als Mediatoren der postischämischen und Endotoxin-induzierten akuten Nierenschädigung. Histone werden von sterbenden renalen Zellen freigesetzt und üben direkte zytotoxische Effekte aus. Darüber hinaus wirken extrazelluläre Histone als Gefahrensignale, welche über die Aktivierung von TLR2 und TLR4 zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine führen. Daher kann festgestellt werden, dass durch eine Nierenzellschädigung ein steriler Entzündungsprozess in Gang gesetzt wird, der programmatisch abläuft, sich selbst verstärkt und sich der gleichen Rezeptoren bedient, die auch bakterielle Muster im Rahmen einer Infektion erkennen. Die Neutralisierung von extrazellulären Histonen könnte eine neue Option für die therapeutische Unterdrückung der sterilen Entzündung bei einer akuten Nierenschädigung und anderen Organschädigungen darstellen.

5 Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Sepsis und Ischämie stellen die häufigsten Ursachen einer intrarenalen akuten Nierenschädigung dar. Hierbei spielt die Überstimulation des Immunsystems eine wesentliche Rolle. In dieser experimentellen Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass aus geschädigten Zellen freigesetzte Histone als „Danger Signale“ an TLR2 und TLR4 binden und damit zur Verstärkung der akuten Nierenschädigung beitragen.

Durch *in-vitro*-Stimulationsexperimente mit Gesamt-Histon-Konzentrationen von 5 bis 300 µg/ml und colorimetrischen Messungen der Zellviabilität konnte ein Dosis-abhängiger toxischer Effekt von extrazellulären Histonen auf renale Endothelzellen und tubuläre Epithelzellen belegt werden.

Primär isolierte renale dendritische Zellen von *Tlr2/4* Knockout- und Wildtyp-Mäusen wurden für 24 Stunden mit Gesamt-Histon-Konzentrationen zwischen 10 und 100 µg/ml inkubiert. Im Anschluss wurde mittels ELISA die Produktion von IL-6 gemessen. Dabei zeigte sich ein Dosis-abhängiger Anstieg der Zytokinproduktion bei Wildtyp-Mäusen, jedoch eine hochsignifikante Reduktion dieses Effekts bei *Tlr2/4* Knockout-Mäusen. Dies weist darauf hin, dass die pro-entzündliche Wirkung von Histonen TLR2/4-abhängig ist.

Zum Nachweis einer immunstimulatorischen Komponente von Histonen *in vivo* wurde die Leukozytenrekrutierung von Wildtyp-Mäusen nach intraskrotaler Histon-Injektion mittels Intravitalmikroskopie postkapillärer Venolen gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Steigerung der Leukozytenadhäsion und –transmigration durch Histone. Dieser Effekt war bei Histonen, welche vor der Injektion mit APC gespalten wurden, nicht nachweisbar.

Der schädigende Effekt von Histonen auf die Niere *in vivo* wurde durch unilaterale Perfusion der linken Nierenarterie bei Wildtyp- und *Tlr2/4* Knockout-Mäusen untersucht. 12 Stunden nach der Vorstimulation mittels intraperitonealer Gabe von 1mg/kg KG LPS wurden je 10 mg/kg KG Histone oder mit APC verdaute Histone in die linke Arteria renalis appliziert und nach weiter 24 Stunden beide Nieren zur histologischen und

molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Dabei zeigten sich in der histologischen Auswertung bei Wildtyp-Mäusen ipsilateral der Histon-Injektion verstärkt Tubulusnekrosen und eine gesteigerte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten. Durch RT-PCR Analysen wurde eine vermehrte Expression von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 nachgewiesen. Bei *Tlr2/4* Knockout-Mäusen, denen extrazelluläre Histone appliziert wurden, waren die beschriebenen Effekte deutlich geringer ausgeprägt und bei Verabreichung von mit APC vorverdauten Histonen blieben die renalen Veränderungen gänzlich aus. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass extrazelluläre Histone zum einen über den TLR2- und TLR4-abhängigen Signalweg pro-inflammatorische Effekte ausüben und zur akuten Nierenschädigung beitragen, aber darüber hinaus auch noch andere Histon-induzierte Mechanismen involviert sind.

Die Rolle von extrazellulären Histonen als Mediatoren der akuten Nierenschädigung wurde zudem dadurch bestätigt, dass die präventive Gabe von neutralisierenden Histon-Antikörpern im Maus-Modell nephroprotektiv wirkte. Zwei Stunden vor der Induktion einer septischen oder ischämischen Nierenschädigung durch intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg KG LPS bzw. durch bilaterale Nierenarterienabklemmung für 30 Minuten wurden je 20 mg/kg KG anti-Histon IgG oder Kontroll-IgG intraperitoneal verabreicht. Nach 24 Stunden zeigten sich in Mäusen, die mit anti-Histon IgG vorbehandelt worden waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant geringerer Anstieg der Serum-Kreatininwerte, eine signifikant geringere tubuläre Schädigung und signifikant weniger infiltrierende neutrophile Granulozyten.

Insgesamt konnte hier die Rolle der extrazellulären Histone für den Gewebsschaden und Funktionsverlust bei der akuten Nierenschädigung belegt werden, wobei Histone direkte toxische Effekte auf tubuläre Epithelzellen, sowie glomeruläre Endothelzellen und pro-entzündliche Effekte via TLR2 und TLR4 vermitteln. Diese Befunde unterstützen das Konzept, dass Nierenzellnekrosen durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems einen Mechanismus auslösen, der ganz erheblich zum Ausmaß der akuten Nierenversagens beiträgt. Der gezeigte protektive Effekt von anti-Histon IgG könnte als Ansatz zur Prävention des akuten Nierenversagens und anderer Organschädigungen genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. Liangos O, Wald R, O'Bell JW, Price L, Pereira BJ, Jaber BL. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2006;1(1):43-51. Epub 2007/08/21.
2. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005;294(7):813-8. Epub 2005/08/18.
3. Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, Lang T, Ploder J, Lenz K, et al. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Critical care medicine*. 2002;30(9):2051-8. Epub 2002/09/28.
4. Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Critical care medicine*. 1992;20(6):724-6. Epub 1992/06/01.
5. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995;273(2):117-23. Epub 1995/01/11.
6. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *The New England journal of medicine*. 2004;351(2):159-69. Epub 2004/07/13.
7. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12. Epub 2004/08/18.
8. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31. Epub 2007/03/03.
9. Schmid H, Schiffl H, Lederer SR. [Acute kidney injury]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2012;107(2):141-6. Epub 2012/03/23. Die akute Nierenschädigung.
10. Khwaja A. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Nephron Clinical practice*. 2012;120(4):179-84. Epub 2012/08/15.
11. Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, Almenoff P, Render ML. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study. *Critical care medicine*. 2009;37(9):2552-8. Epub 2009/07/16.
12. Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, Schusterschitz N, Moreno R, Druml W, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive care medicine*. 2009;35(10):1692-702. Epub 2009/06/24.
13. Bienholz A, Feldkamp T, Kribben A. [Acute kidney injury]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2013;138(23):1229-32. Epub 2013/05/31. Akutes Nierenversagen: Update 2013.
14. Feldkamp T, Bienholz A, Kribben A. [Acute kidney injury]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2011;136(5):194-7. Epub 2011/01/29. Akutes Nierenversagen.
15. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*. 2013;382(9887):170-9. Epub 2013/06/04.
16. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-66. Epub 2012/05/24.

17. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(6):999-1006. Epub 2011/05/14.
18. Beutler B, Rehli M. Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. *Current topics in microbiology and immunology*. 2002;270:1-21. Epub 2002/12/07.
19. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(11):F1487-94. Epub 2012/09/21.
20. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(10):2868-78. Epub 2009/10/07.
21. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 2009;4(1):31-6. Epub 2009/01/10.
22. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*. 2005;24 Suppl 1:19-23. Epub 2005/12/24.
23. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*. 2000;13(2):110-6. Epub 2000/02/12.
24. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330(6149):662-4. Epub 1987/12/17.
25. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *The New England journal of medicine*. 1996;334(26):1697-702. Epub 1996/06/27.
26. Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol*. 2004;172(4):2629-35. Epub 2004/02/07.
27. Wang W, Falk SA, Jittikanont S, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Protective effect of renal denervation on normotensive endotoxemia-induced acute renal failure in mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;283(3):F583-7. Epub 2002/08/09.
28. Hohenstein B, Braun A, Amann KU, Johnson RJ, Hugo CP. A murine model of site-specific renal microvascular endothelial injury and thrombotic microangiopathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(4):1144-56. Epub 2007/11/30.
29. Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(2):345-52. Epub 2009/12/19.
30. Schmidt C, Steinke T, Moritz S, Graf BM, Bucher M. [Acute renal failure and sepsis : Just an organ dysfunction due to septic multiorgan failure?]. *Der Anaesthesist*. 2010;59(8):682-99. Epub 2010/08/10. Akutes Nierenversagen und Sepsis : Nur eine Organdysfunktion bei septischem Multiorganversagen?
31. Karajala V, Mansour W, Kellum JA. Diuretics in acute kidney injury. *Minerva anesthesiologica*. 2009;75(5):251-7. Epub 2008/07/19.

32. Ho KM, Sheridan DJ. Meta-analysis of frusemide to prevent or treat acute renal failure. *BMJ*. 2006;333(7565):420. Epub 2006/07/25.
33. Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Chertow GM. Diuretics, mortality, and nonrecovery of renal function in acute renal failure. *JAMA*. 2002;288(20):2547-53. Epub 2002/11/28.
34. De Vriese AS, Bourgeois M. Pharmacologic treatment of acute renal failure in sepsis. *Current opinion in critical care*. 2003;9(6):474-80. Epub 2003/11/26.
35. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *The New England journal of medicine*. 2000;343(3):180-4. Epub 2000/07/20.
36. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001;281(3):R730-7. Epub 2001/08/17.
37. Kelly AM, Dwamena B, Cronin P, Bernstein SJ, Carlos RC. Meta-analysis: effectiveness of drugs for preventing contrast-induced nephropathy. *Annals of internal medicine*. 2008;148(4):284-94. Epub 2008/02/20.
38. Fishbane S. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(1):281-7. Epub 2007/11/16.
39. Komisarof JA, Gilkey GM, Peters DM, Koudelka CW, Meyer MM, Smith SM. N-acetylcysteine for patients with prolonged hypotension as prophylaxis for acute renal failure (NEPHRON). *Critical care medicine*. 2007;35(2):435-41. Epub 2007/01/06.
40. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 2001;345(19):1368-77. Epub 2002/01/17.
41. Lin SM, Huang CD, Lin HC, Liu CY, Wang CH, Kuo HP. A modified goal-directed protocol improves clinical outcomes in intensive care unit patients with septic shock: a randomized controlled trial. *Shock*. 2006;26(6):551-7. Epub 2006/11/23.
42. Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;3:CD004388. Epub 2012/03/16.
43. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26. Epub 2007/10/19.
44. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Epub 2006/02/25.
45. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009;21(4):317-37. Epub 2009/02/28.
46. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300. Epub 2002/04/16.
47. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1989;54 Pt 1:1-13. Epub 1989/01/01.
48. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(4):279-89. Epub 2008/03/15.
49. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):826-37. Epub 2010/11/23.

50. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*. 1994;12:991-1045. Epub 1994/01/01.
51. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal*. 2012;31(5):1062-79. Epub 2012/01/19.
52. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(3):416-25. Epub 2011/02/22.
53. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23. Epub 2013/02/27.
54. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*. 2008;3:99-126. Epub 2007/11/28.
55. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4):359-65. Epub 2005/06/16.
56. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83. Epub 1996/09/20.
57. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16-34. Epub 2011/01/18.
58. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84. Epub 2010/04/21.
59. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8. Epub 1998/12/16.
60. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007;130(5):906-17. Epub 2007/09/07.
61. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20. Epub 2010/03/23.
62. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*. 2010;2(3):161-75. Epub 2010/01/01.
63. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*. 1986;232(4753):977-80. Epub 1986/05/23.
64. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(6):559-73. Epub 1991/12/01.
65. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993;103(2):565-75. Epub 1993/02/01.
66. Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2000;15:298-303. Epub 2001/06/08.

67. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(2):311-20. Epub 1998/02/07.
68. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in immunology*. 2002;14(2):83-92. Epub 2002/04/30.
69. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney international*. 2004;66(2):480-5. Epub 2004/07/16.
70. Luscinskas FW, Lim YC, Lichtman AH. Wall shear stress: the missing step for T cell transmigration? *Nature immunology*. 2001;2(6):478-80. Epub 2001/05/29.
71. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30(11):513-21. Epub 2009/08/25.
72. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5. Epub 2004/03/06.
73. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB*. 2006;16(4):401-7. Epub 2006/02/21.
74. Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *Journal of innate immunity*. 2009;1(3):181-93. Epub 2009/01/01.
75. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaniananda V, Nietzsche S, Thywissen A, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000873. Epub 2010/05/06.
76. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malaria journal*. 2008;7:41. Epub 2008/03/04.
77. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2007;2007(379):pe11. Epub 2007/03/30.
78. De Meyer SF, Suidan GL, Fuchs TA, Monestier M, Wagner DD. Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(8):1884-91. Epub 2012/05/26.
79. Dorner T. SLE in 2011: Deciphering the role of NETs and networks in SLE. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(2):68-70. Epub 2012/01/11.
80. Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner WD. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009;44(5):664-72. Epub 2009/05/21.
81. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine*. 2007;13(4):463-9. Epub 2007/03/27.
82. Rogers NM, Matthews TJ, Kausman JY, Kitching AR, Coates PT. Review article: Kidney dendritic cells: their role in homeostasis, inflammation and transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(7):625-35. Epub 2009/10/03.
83. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Epub 1998/04/01.

84. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*. 1973;137(5):1142-62. Epub 1973/05/01.
85. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *The Journal of experimental medicine*. 1979;149(1):1-16. Epub 1979/01/01.
86. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international*. 2007;71(7):619-28. Epub 2007/02/22.
87. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(11):4210-21. Epub 2011/11/03.
88. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2847-59. Epub 2007/09/15.
89. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-93. Epub 2002/01/22.
90. Chen J, John R, Richardson JA, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, et al. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney international*. 2011;79(3):288-99. Epub 2010/10/12.
91. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2007;178(10):6252-8. Epub 2007/05/04.
92. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney international*. 2002;62(5):1539-49. Epub 2002/10/10.
93. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol*. 2009;130(1):41-50. Epub 2008/10/17.
94. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol*. 2004;173(12):7115-9. Epub 2004/12/09.
95. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(6):784-9. Epub 2004/02/19.
96. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(10):2894-903. Epub 2005/09/17.
97. De Greef KE, Ysebaert DK, Persy V, Vercauteren SR, De Broe ME. ICAM-1 expression and leukocyte accumulation in inner stripe of outer medulla in early phase of ischemic compared to HgCl₂-induced ARF. *Kidney international*. 2003;63(5):1697-707. Epub 2003/04/05.
98. Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(2):812-6. Epub 1994/01/18.
99. Martins PS, Brunialti MK, da Luz Fernandes M, Martos LS, Gomes NE, Rigato O, et al. Bacterial recognition and induced cell activation in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6(2):183-91. Epub 2006/06/22.
100. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(4):1162-72. Epub 1988/04/01.
101. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, et al. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(6):1106-15. Epub 2008/03/14.
102. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:568396. Epub 2010/04/17.
103. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074-80. Epub 2001/08/11.
104. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974;184(4139):868-71. Epub 1974/05/24.
105. Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. 2003;423(6936):145-50. Epub 2003/05/09.
106. Zhou Y, Xu A, Ling X. [The expression of nm23-H1 and p53 protein in nasopharyngeal carcinoma]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 1998;12(6):243-6. Epub 2001/02/24.
107. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003;421(6921):448-53. Epub 2003/01/24.
108. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63. Epub 2004/05/28.
109. Mazzi EA, Soliman KF. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2012;7(2):119-30. Epub 2012/03/08.
110. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5. Epub 2000/01/19.
111. Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat*. 2010;192(5):261-74. Epub 2010/08/27.
112. Hirsch JG. Bactericidal action of histone. *The Journal of experimental medicine*. 1958;108(6):925-44. Epub 1958/12/01.
113. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine*. 2009;15(11):1318-21. Epub 2009/10/27.
114. Chaput C, Zychlinsky A. Sepsis: the dark side of histones. *Nature medicine*. 2009;15(11):1245-6. Epub 2009/11/07.
115. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hagele H, Lichtnekert J, et al. Histones from Dying Renal Cells Aggravate Kidney Injury via TLR2 and TLR4. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(8):1375-88. Epub 2012/06/09.
116. Akis N, Madaio MP. Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli. *Kidney international*. 2004;65(6):2223-7. Epub 2004/05/20.

117. Monestier M, Fasy TM, Losman MJ, Novick KE, Muller S. Structure and binding properties of monoclonal antibodies to core histones from autoimmune mice. *Mol Immunol.* 1993;30(12):1069-75. Epub 1993/08/01.
118. Terryn S, Jouret F, Vandenabeele F, Smolders I, Moreels M, Devuyst O, et al. A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *American journal of physiology Renal physiology.* 2007;293(2):F476-85. Epub 2007/05/04.
119. Hagemann JH, Thomasova D, Mulay SR, Anders HJ. Nrf2 signalling promotes ex vivo tubular epithelial cell survival and regeneration via murine double minute (MDM)-2. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2013;28(8):2028-37. Epub 2013/03/12.
120. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, et al. Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2011;22(2):306-16. Epub 2010/12/18.
121. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlondorff D, Luckow B, Krombach F. Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *J Leukoc Biol.* 2006;79(1):114-22. Epub 2005/11/09.
122. Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Moser CM, Linder S, Khandoga A, et al. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *J Leukoc Biol.* 2008;83(4):864-74. Epub 2008/01/05.
123. Hagele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ. Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *The American journal of pathology.* 2009;175(5):1896-904. Epub 2009/10/17.
124. Lech M, Avila-Ferrufino A, Allam R, Segerer S, Khandoga A, Krombach F, et al. Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. *J Immunol.* 2009;183(6):4109-18. Epub 2009/08/21.
125. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 2005;39(1):75-85. Epub 2005/08/03.
126. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry.* 1997;245(2):154-60. Epub 1997/02/15.
127. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology.* 1992;119(3):493-501. Epub 1992/11/01.
128. Schmidt RE, Parvin CA, Green KG. Synaptic ultrastructural alterations anticipate the development of neuroaxonal dystrophy in sympathetic ganglia of aged and diabetic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(12):1166-86. Epub 2008/11/20.
129. Yamada K, Miwa T, Liu J, Nangaku M, Song WC. Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59. *J Immunol.* 2004;172(6):3869-75. Epub 2004/03/09.
130. Geisel J, Kahl F, Muller M, Wagner H, Kirschning CJ, Autenrieth IB, et al. IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J Immunol.* 2007;179(9):5811-8. Epub 2007/10/20.

131. Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol.* 2011;187(5):2626-31. Epub 2011/07/26.
132. Gupta A, Rhodes GJ, Berg DT, Gerlitz B, Molitoris BA, Grinnell BW. Activated protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and downregulates renal INOS and angiotensin 2. *American journal of physiology Renal physiology.* 2007;293(1):F245-54. Epub 2007/04/06.
133. Cartwright N, Murch O, McMaster SK, Paul-Clark MJ, van Heel DA, Ryffel B, et al. Selective NOD1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(6):595-603. Epub 2007/01/20.
134. Schmidt C, Hoehrl K, Bucher M. Cytokine-mediated regulation of urea transporters during experimental endotoxemia. *American journal of physiology Renal physiology.* 2007;292(5):F1479-89. Epub 2007/01/19.
135. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology.* 2011;54(3):999-1008. Epub 2011/07/02.
136. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine.* 2009;15(6):623-5. Epub 2009/05/19.
137. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney international.* 2002;62(1):237-44. Epub 2002/06/26.
138. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(7):4135-42. Epub 1998/03/28.
139. Anders HJ. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2010;21(8):1270-4. Epub 2010/07/24.
140. Gowda NM, Wu X, Gowda DC. The nucleosome (histone-DNA complex) is the TLR9-specific immunostimulatory component of *Plasmodium falciparum* that activates DCs. *PloS one.* 2011;6(6):e20398. Epub 2011/06/21.
141. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock.* 2006;26(2):174-9. Epub 2006/08/01.
142. Pawar RD, Castrezana-Lopez L, Allam R, Kulkarni OP, Segerer S, Radomska E, et al. Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e206-21. Epub 2009/01/30.
143. Muller WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary pathology.* 2013;50(1):7-22. Epub 2013/01/25.
144. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology.* 2007;7(9):678-89. Epub 2007/08/25.
145. Frommhold D, Tschada J, Braach N, Buschmann K, Doerner A, Pflaum J, et al. Protein C concentrate controls leukocyte recruitment during inflammation and improves survival during endotoxemia after efficient in vivo activation. *The American journal of pathology.* 2011;179(5):2637-50. Epub 2011/09/13.

146. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*. 2003;102(4):1499-505. Epub 2003/04/26.
147. Elphick GF, Sarangi PP, Hyun YM, Hollenbaugh JA, Ayala A, Biffl WL, et al. Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration. *Blood*. 2009;113(17):4078-85. Epub 2009/02/27.
148. Jackson CJ, Xue M. Activated protein C--an anticoagulant that does more than stop clots. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(12):2692-7. Epub 2008/02/06.
149. Scaldaferri F, Sans M, Vetrano S, Graziani C, De Cristofaro R, Gerlitz B, et al. Crucial role of the protein C pathway in governing microvascular inflammation in inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(7):1951-60. Epub 2007/06/09.
150. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nature medicine*. 2007;13(11):1349-58. Epub 2007/11/06.
151. Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(11):1878-90. Epub 2010/09/18.
152. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9813-8. Epub 2010/05/05.
153. Kumar SV, Kulkarni OP, Mulay SR, Darisipudi MN, Romoli S, Thomasova D, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015. Epub 2015/02/04.

7 Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

ANP	atriales natriuretisches Peptid
APC	Aktiviertes Protein C
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CASP	colon ascendens stent peritonitis
CCL2	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2
CCL5	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 5
CLP	cecal ligation and puncture
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
dsRNA	Doppelsträngige RNA (double stranded RNA)
DC	dendritische Zelle (renal dendritic cell)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde (hour)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthetase (induzierte NO-Synthetase)
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulierender Faktor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration in Mol / Liter
MAP	Mitogen-activated protein
MCP-1	Monocyte chemo-attractant protein 1
MODS	Multiorganversagen (Multi-Organ Dysfunction Syndrome)
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid -Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NFκB	Nuclear factor κB
PAMP	Pathogen-assoziierte Strukturmoleküle (Pathogen-associated-molecular-pattern)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule – 1
PS	Penicillin-Streptomycin
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
rDC	renale dendritische Zelle (renal dendritic cell)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuclease

RPMI-1640	Zellkulturmedium vom Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standard error of the mean
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
ssRNA	Einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	TIR-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR containing adaptor-inducing Interferon β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
U	Einheit (Unit)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Frowth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World-Health Organisation)

8 Danksagung

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Bearbeitung dieses interessanten Forschungsprojektes anvertraut hat. Als Mentor hat er es verstanden mich für die wissenschaftliche Arbeit zu begeistern und mir ermöglicht meine Daten bei nationalen und internationalen Foren zu präsentieren. Seine Disziplin und Motivation sind mir stets ein großes Vorbild. Herrn Professor Dr. Reincke und Herrn Professor Dr. Dr. Heesemann möchte ich für die Organisation und Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU danken.

Herrn Professor Dr. med. vet. Dr. med habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. med. Christoph Reichel danke ich für die Durchführung der intravital-mikroskopischen Endothelstudien im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der LMU München. Prof. Dr. med. Bernd Hohenstein und Prof. Dr. med. Christian Hugo aus der Abteilung Nephrologie des Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden danke ich für die gemeinsame methodische Umsetzung der unilateralen Nierenarterienperfusion mit Histonen in ihrem Labor. Ich danke Frau Professor Helen Liapis aus der Abteilung für Pathologie und Immunologie der Washington University School of Medicine, St. Louis, USA für die Erstellung ihrer elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Frau Dr. Neşe Akış der Thrakien Universität, Türkei danke ich für die Isolation und Bereitstellung der murinen glomerulären Endothelzellen (GEnC). Die BWA3-Hybridomazellen zur Produktion von anti-Histon IgGs wurden freundlicherweise von Professor Marc Monestier aus dem Temple Autoimmunity Center der Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt. Mein Dank gilt auch Professor Dr. Liliana Schaefer und Dr. Kristin Moreth vom Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der Goethe-Universität, Frankfurt am Main für die Bereitstellung von *Tlr2/4* Knockout-Mäusen.

Besonders danken möchte ich Murthy N. Darisipudi und Shrikant R. Mulay, die mich geduldig in unterschiedlichste experimentelle Methoden eingeführt haben und mir bei allen Fragen stets hilfreich zur Seite standen. Allam Ramanjaneyulu und Holger Hägele danke ich für die exzellente Vorarbeit zur Bearbeitung meines Forschungsthemas. Mein Dank geht auch an Janina Mandelbaum, Dan Draganovici, Ewa Radomska und Heni E. Susanti für ihre

technische Unterstützung. Meinen Mitdoktoranden Marc Weidenbusch, Jan Hagemann und Regina Gröbmayer, sowie allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern unseres Labors sei an dieser Stelle für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit gedankt.

Ganz herzlichen danken möchte ich meinen Freunden für den außerordentlichen Zusammenhalt in allen Lebenslagen. In tiefster Verbundenheit danke ich meinen Eltern, Werner und Christel, sowie meinen Schwestern, Vanessa und Carmen Scherbaum, die immer für mich da waren und sind und mir während der Anfertigung dieser Dissertation jederzeit zur Seite standen.